

細胞内シグナル伝達異常を基礎にした
神経障害モデルの解析

Analysis of intracellular signaling pathways
in cellular models of neurological disorder

2018 年 2 月

小高 陽樹

Haruki ODAKA

細胞内シグナル伝達異常を基礎にした
神経障害モデルの解析

Analysis of intracellular signaling pathways
in cellular models of neurological disorder

2018 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
生命医科学専攻 神経生理学研究

小高 陽樹

Haruki ODAKA

目次

第 1 章 緒言.....	1
第 2 章 酸化ストレスに対するカベルゴリンの神経保護作用の解析	
2-1. 概要.....	4
2-2. 序論.....	5
2-2-1. 酸化ストレスと神経脱落	
2-2-2. 麦角系ドーパミン D2 様受容体アゴニスト、カベルゴリン	
2-2-3. パーキンソン病モデルにおけるドーパミン D2 受容体アゴニストの神経保護作用	
2-2-4. 黒質-線条体以外の脳部位におけるドーパミン D2 受容体アゴニストの薬理作用	
2-3. 実験方法.....	8
2-3-1. 大脳皮質ニューロンの初代培養	
2-3-2. 薬剤処理	
2-3-3. MTT assay	
2-3-4. Calcein assay	
2-3-5. 免疫染色	
2-3-6. タンパク質抽出とウェスタンブロッティング	
2-3-7. 細胞膜上タンパク質の抽出	
2-3-8. 細胞外グルタミン酸の測定	
2-3-9. RNA 抽出、逆転写反応、Real-time PCR	
2-3-10. 統計処理	
2-4. 実験結果.....	13
2-4-1. H ₂ O ₂ 曝露は神経細胞死を誘導する	
2-4-2. カベルゴリンは用量および前処置時間依存的に神経細胞死を抑制する	
2-4-3. カベルゴリンは酸化ストレスによるアポトーシスの誘導を抑制する	
2-4-4. カベルゴリンはドーパミン D2 受容体刺激を介して神経保護作用を発揮する	
2-4-5. カベルゴリンの投与は大脳皮質ニューロンの BDNF 発現に影響しない	
2-4-6. H ₂ O ₂ 曝露は ERK、p38 シグナルを活性化させ、細胞死を誘導する	
2-4-7. カベルゴリンは H ₂ O ₂ 曝露による ERK 1/2、p38 の活性化を阻害する	

- 2-4-8. H₂O₂ 曝露は脳皮質ニューロンの興奮毒性を引き起こす
- 2-4-9. カベルゴリンはグルタミン酸受容体の発現に影響しない
- 2-4-10. カベルゴリンは H₂O₂ 曝露が引き起こす細胞外グルタミン酸の蓄積を阻害する
- 2-4-11. カベルゴリンはグルタミン酸トランスポーターの発現を上昇させる

2-5. 考察.....26

- 2-5-1. カベルゴリンの神経保護作用とドーパミン D2 受容体
- 2-5-2. カベルゴリンと BDNF
- 2-5-3. 酸化ストレスと MAPK カスケードの活性化
- 2-5-4. カベルゴリンと MAPK シグナル
- 2-5-5. 酸化ストレスと興奮毒性
- 2-5-6. カベルゴリンとグルタミン酸トランスポーター
- 2-5-7. 酸化ストレスの下流経路をターゲットとした AD 治療の可能性

第3章 グルココルチコイド曝露による神経新生障害の解析

3-1. 概要.....32

3-2. 序論.....33

- 3-2-1. 外的ストレスとグルココルチコイド
- 3-2-2. 母体ストレスと、出生児における発達障害（疫学研究）
- 3-2-3. 母体ストレスと行動学的異常（動物モデル）
- 3-2-4. GCs による神経新生障害（細胞モデル）

3-3. 実験方法.....39

- 3-3-1. eNSPCs の初代培養
- 3-3-2. 薬剤
- 3-3-3. MTT assay
- 3-3-4. 免疫染色
- 3-3-5. タンパク質抽出とウェスタンブロッティング
- 3-3-6. 統計処理

3-4. 実験結果.....41

- 3-4-1. GC の曝露は、eNSPCs の増殖には影響を与えない
- 3-4-2. 神経分化誘導に伴うマーカータンパク質の発現変動
- 3-4-3. GC 曝露は eNSPCs の神経分化を抑制し、その細胞生存率を減少させる

3-4-4. GC は、eNSPCs の神経分化に伴う ERK1/2 と Akt の活性化を抑制する	
3-4-5. ERK シグナルの活性化は細胞の生存を、Akt シグナルの活性化は神経分化と細胞の生存の双方に重要である	
3-4-6. IGF-I による Akt 活性化の促進と、CORT による神経分化障害の是正	
3-5. 考察.....	50
3-5-1. GC による神経分化抑制作用と GC の低親和性受容体 GR	
3-5-2. 神経分化と ERK・PI3K/Akt シグナル	
3-5-3. GCs と ERK・PI3K/Akt シグナル	
3-5-4. アストロサイト分化と GCs	
3-5-5. PI3K/Akt シグナルと Wnt・Hedgehog シグナル	
3-5-6. IGF-I と GCs	
第 4 章 総括.....	54
謝辞.....	56
参考文献.....	57

第 1 章：緒言

神経細胞の分化や生存、シナプス形成、および神経伝達活動といった細胞活動は、細胞外の環境に大きく影響される。細胞外環境を構成する因子には、温度や pH、機械的刺激といった物理的なものから、神経細胞間でやりとりされる神経伝達物質、局所的に分泌される神経栄養因子や増殖因子、血管を通して運ばれる栄養素やホルモンなど、化学物質や介在分子までが考えられ、実に多種多様である。こうした細胞外環境因子による刺激は、細胞内のシグナル伝達経路に変換・集約されることで、細胞外環境に応じた細胞活動を誘発する。細胞内シグナル伝達経路は、細胞膜や細胞質に存在する受容体を、細胞外環境因子が活性化することで開始され、シグナル分子と呼ばれる生体物質群の活性化・不活性化を連鎖的に変化させる。そして、転写因子などの機能性タンパク質の活性を変化させ、多様な細胞動態を発現させる。神経系の発達過程や疾患罹患時に、薬剤投与などにより細胞外環境が劇的に変化する際は、シグナル伝達系の活性も大きく変化する。こうした特定の状況下におけるシグナル伝達の変化を捉えることは、環境変化に対する細胞の応答を理解する上で極めて重要である。

細胞内でシグナル分子として作用する生体物質は、ヌクレオチド (cAMP、cGMP) や金属イオン (Ca^{2+})、脂質 (inositol triphosphate、diacylglycerol) など様々だが、中でもシグナルタンパク質は種類が多く、多くのシグナル伝達経路を構成している。シグナルタンパク質が構成する代表的な伝達経路として、リン酸化カスケードが挙げられる。リン酸化カスケードは、リン酸化・脱リン酸化酵素により構成されるシグナル伝達経路であり、あるリン酸化酵素 A が標的となる別のリン酸化酵素 B をリン酸化することで活性化させ、活性化した B がさらに別のリン酸化酵素 C をリン酸化し活性化させるといったように、タンパク質のリン酸化・脱リン酸化による酵素活性の変化を $A \rightarrow B \rightarrow C$ と連鎖的に引き起こすことでシグナルを伝達する。神経栄養因子や増殖因子といった分泌タンパク質の多くは、リン酸化カスケードを活性化する代表的な細胞外環境因子である。これらの因子の受容体は、リガンドの結合により活性化し下流シグナル分子をリン酸化する receptor tyrosine kinase (RTK) であり、リン酸化カスケードを直接的に活性化する (Katz et al., 2007)。一方で、主に神経伝達物質等による制御を受ける cAMP や Ca^{2+} といった低分子のシグナル分子にも、cAMP 依存的に活性化する protein kinase a や Ca^{2+} 依存的に活性化する calcium-calmodulin-dependent protein kinase を介して、間接的にリン酸化カスケードを活性化する経路が存在しており、リン酸化カスケードが多様な細胞外刺激のメディエーターとして働くことが伺える (Waltereit and Weller, 2003; Enslen et al., 1996)。

活性化した細胞内シグナル伝達経路は最終的に細胞活動の変化を引き起こすが、同じシグナル伝達経路であっても最終的な細胞表現型は細胞種や細胞外刺激の種

類により異なる。特に、extracellular signal-related kinase (ERK) シグナルは成長因子から炎症性サイトカインまで様々な細胞外刺激に応答して活性化するため、表現型への影響も多様である。例えば、成長因子である basic fibroblast growth factor による extracellular signal-related kinase (ERK) シグナルの活性化は、神経前駆細胞の増殖促進と自己複製の維持に働くのに対し、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) や nerve growth factor による ERK シグナルの活性化は、神経前駆細胞の神経分化を促進する (Sato et al., 2010; Liu et al., 2014)。また、BDNF による ERK シグナルの活性化は神経細胞のシナプス形成や生存を促進するのに対し、tumor necrosis factor- α による ERK シグナルの増強は神経細胞死を誘導する (Almeida et al., 2005; Kumamaru et al., 2011; Jara et al., 2007)。このような細胞応答の差は、シグナル活性化の強度・時間の違いや同時に活性化するシグナルとのクロストークの違いにより生じると考えられている (Lu and Xu., 2006)。このように、細胞内シグナル伝達の変化がもたらす表現型の変化は、環境により大きく異なる可能性があるため、特定の状況下におけるシグナル変化と表現型変化の因果関係を明らかにすることは重要である。

疾患の病変部位における細胞内シグナル伝達の異常を同定することができれば、細胞内シグナルを正常化することで、細胞病態が改善できる可能性がある。実際に、細胞内シグナル伝達経路を標的とした治療薬の実例として、皮膚癌の一種、メラノーマ (悪性黒色腫) の治療薬であるトラメチニブが挙げられる (Samatar et al., 2014)。メラノーマは、皮膚の色素産生細胞であるメラノサイトが遺伝子変異を起こすことで生じる悪性腫瘍であり、症例の約 50%において BRAF 遺伝子の変異が認められる (Ascierto et al., 2012)。BRAF は、RAS-RAF-MEK-ERK 経路 (ERK シグナル伝達経路) を構成するセリン/スレオニンキナーゼである。BRAF 変異型メラノーマでは、BRAF に常活性化変異が生じることにより、ERK シグナルの恒常的な活性化が起こり、細胞の異常増殖を誘導すると考えられている。このため、ERK シグナル伝達経路をターゲットとした薬剤として、変異型 BRAF の阻害剤とともに BRAF の下流シグナル分子である MEK の阻害剤 (トラメチニブ) が開発され、メラノーマの治療薬として有効であることが認められている (Samatar et al., 2014)。この事例は、変異タンパク質だけでなく、その下流シグナル分子も創薬のターゲットとなり得ることを実証した点で重要である。

中枢神経系における疾患は、その発症時期により神経変性疾患と神経発達障害の2つに大別される。神経変性疾患は、成人後に発症し、神経細胞の細胞死を特徴的な病態とするのに対し、神経発達障害は、神経系の発達期に異常が生じ、特に神経前駆細胞から成熟神経細胞へと至る分化・成熟過程の障害がみられる。いずれの疾患も有効な治療法が乏しく、新たな治療法の開発が望まれている。本研究では、両疾患の病態を細胞レベルで再現し、シグナル伝達の異常を同定することで、シグナル伝達をターゲットとした治療法の可能性を検証することを目的と

した。

本論文では、神経変性疾患と神経発達障害の細胞モデルを用いて、それぞれのモデル系における細胞障害と細胞内シグナル伝達異常との関連を解析した結果を、報告する。神経変性疾患の細胞モデルとして、アルツハイマー病やパーキンソン病など複数の神経変性疾患の病態に關与する酸化ストレスによる神経細胞死モデルを用いて、パーキンソン病治療薬であるカベルゴリンがもつ神経保護作用を解析した。酸化ストレス負荷時の細胞内シグナル伝達を解析した結果、ERK および p38 シグナルが細胞死誘導シグナルとして働き、カベルゴリンがそれらを抑制することを見出した。また、カベルゴリンの投与は酸化ストレス曝露による細胞外グルタミン酸の蓄積を抑制しており、そのメカニズムとしてグルタミン酸トランスポーターの発現上昇が關与している可能性を示した。続いて、神経発達障害のモデルとして、神経発達期に曝露されることで神経発達障害の発症リスクを高めることが知られているグルココルチコイド (GC) を、神経幹/前駆細胞に負荷した際の影響を解析した。神経幹/前駆細胞は、分化誘導条件下において ERK および PI3K/Akt シグナル経路の顕著な活性上昇を示し、これらのシグナル経路は、神経分化と生存に寄与していた。また、GC 負荷は、それらのシグナル伝達経路を抑制することで、神経分化を障害することが明らかになった。さらに、PI3K/Akt シグナルの活性化因子のひとつである **Insulin-like growth factor-I (IGF-I)** を投与することにより、GC による神経分化抑制作用が減弱することを見出した。これらの結果から、神経変性および神経発達障害を想定した *in vitro* モデルにおける細胞障害に、細胞内シグナル伝達異常が密接に關与しており、その正常化は疾患治療ターゲットとなり得る可能性を示すことができた。

第2章：酸化ストレスに対するカベルゴリンの神経保護作用の解析

2-1. 概要

神経変性疾患や脳虚血における神経脱落には酸化ストレスが関与していることが示唆されている。このような神経変性疾患の治療薬として、酸化ストレスに対し保護作用を示す化合物に注目が集まっている。ドーパミン D2 様受容体アゴニストであり、PD の治療薬として用いられているカベルゴリンは、PD モデルにおいて黒質の神経細胞を酸化ストレスから保護する作用を持つことで知られるが、他の脳部位の神経細胞に対しても同様の保護効果を示すのかは不明であった。本研究において私は、カベルゴリンが培養大脳皮質ニューロンの酸化ストレス

(H_2O_2) による細胞死を、顕著に抑制することを見出した。このカベルゴリンの作用は、その用量および前処置時間の長さに応じて増大し、またドーパミン D2 受容体アンタゴニストにより消失した。カベルゴリンは、酸化ストレス誘発剤の H_2O_2 投与が誘導する ERK および p38 シグナルの活性化を阻害した。また、ERK シグナルおよび p38 シグナル阻害剤もカベルゴリン同様の神経保護作用を示した。さらに、カベルゴリン投与後では、 H_2O_2 による細胞外グルタミン酸蓄積を除去するグルタミン酸トランスポーター (EAAC1、GLT-1) の発現が上昇した。これらの結果は、カベルゴリンが、 H_2O_2 による細胞外グルタミン酸の蓄積を減少させ、細胞死シグナルの活性化を阻害することで、大脳皮質ニューロンを保護する可能性を示唆している。

2-2. 序論

2-2-1. 酸化ストレスと神経脱落

アルツハイマー病 (AD) やハンチントン病 (HD)、パーキンソン病 (PD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、脳虚血など脳疾患の多くは、病態として神経細胞の脱落が観察される (Feng and Wang., 2012; Johri and Beal 2012; Hauser and

Hastings., 2013; Barber and Shaw., 2010; Pradeep and Diya., 2012)。哺乳類の中樞神経系の再生能は極めて限定的であり、通常、失われた神経細胞が再生することはない。そのため、神経細胞の脱落を抑制することが、疾患の進行を抑制する上で極めて重要である。神経脱落の原因は、疾患ごとに諸説が提唱あるが、上述の疾患群において共通するメカニズムとして、酸化ストレスの関与が知られている

(Feng and Wang., 2012; Johri and Beal 2012; Hauser and Hastings., 2013; Barber and Shaw., 2010; Pradeep and Diya., 2012)。例えば、大脳皮質を中心に神経脱落を起こす AD 患者の脳では、タンパク質や脂質、核 DNA、ミトコンドリア DNA、および糖鎖などが高レベルの酸化を受けていることが報告されている (Feng and Wang., 2012)。酸化ストレスは細胞が高レベルの活性酸素種にさらされた際に生じる。細胞内の活性酸素種は、主にミトコンドリア代謝の副産物として生じるが、通常、すぐに内在性の抗酸化酵素により除去される。しかし、ミトコンドリアの代謝異常による活性酸素種の過剰生成や、抗酸化酵素の減少などにより活性酸素種の生成と除去のバランスが崩れると、細胞内に活性酸素種が蓄積して酸化ストレスを生じる (Numakawa et al., 2011)。酸化ストレスは、脂質酸化による膜タンパク質の機能異常やタンパク質酸化による細胞内タンパク質の機能異常、DNA 酸化による DNA 構造の崩壊などを引き起こし、最終的には細胞死を誘導すると考えられている (Feng and Wang., 2012)。そこで、酸化ストレスを原因とする神経細胞死を抑制する薬剤が、疾患治療薬の候補として注目されている。

2-2-2. 麦角系ドーパミン D2 様受容体アゴニスト、カベルゴリン

カベルゴリンは、麦角菌から抽出された麦角アルカロイドの誘導体として開発された、麦角系ドーパミン D2 様受容体アゴニストである (Kvernmo et al., 2006)。D2 様受容体ファミリーは D2, D3, D4 受容体からなる Gi 型 G タンパク質共役型受容体ファミリーであり、神経伝達物質であるドーパミンにより活性化され、その後、アデニル酸シクラーゼを不活性化し cAMP の産生を低下させる

(Jackson and Westlind-Danielsson., 1994)。カベルゴリンは特に D2 受容体に対し非常に高い親和性を有する (D2, D3, D4 受容体に対しそれぞれ $K_i=0.7, 1.5, 9.0$ nM) (Kvernmo et al., 2006)。カベルゴリンはドーパミン刺激の欠乏が生じる疾患の治療薬として使用されており、PD、高プラクチン血症、卵巣過剰刺激症候群、クッシング病、むずむず脚症候群などに応用されている (Baas and Schueler.,

2001; Wang et al., 2012; Kalampokas et al., 2013; Feelders and Hofland., 2013; Scholz et al., 2011; Curran and Perry., 2004)。カベルゴリンは他の D2 様受容体アゴニストに比べ、半減期が長い (63-109 時間) ため、投薬頻度が少なく済むという利点がある (Baas and Schueler., 2001; Curran and Perry., 2004)。また、ドーパミン受容体アゴニストの副作用として頻繁におこる消化器障害や幻覚、妄想、ジスキネジア (異常な不随意運動)、ジストニア (筋緊張異常) の発生が少ない (Baas and Schueler., 2001)。ただし、麦角系アルカロイド特有の副作用として、まれに心臓弁膜症や線維症を引き起こすことがあるため、長期間、大量に服薬する際は、定期的な心エコー検査が必要である (Curran and Perry., 2004)。

2-2-3. パーキンソン病モデルにおけるドーパミン D2 受容体アゴニストの神経保護作用

PD は、運動制御に関わる黒質-線条体系のドーパミン作動性ニューロンが脱落することで、運動機能障害を生じる神経変性疾患である。興味深いことに、カベルゴリンは、PD モデル動物においてドーパミン作動性ニューロンの脱落を抑制することが報告されている (Yoshioka et al., 2002)。オスの ICR マウスに対するカベルゴリンの投与 (1 日 1 回 7 日間腹腔内投与) は、6-hydroxydopamine (ドーパミン作動性ニューロンに取り込まれ、活性酸素種を産生) の脳室内投与による黒質-線条体系の神経脱落を抑制する (Yoshioka et al., 2002)。また Kai-Yin Chau らのグループは、paraquat (活性酸素種を産生) の投与による神経芽細胞腫 SH-SY5Y の細胞死が、カベルゴリンの共投与により抑制されることを示した (Chau et al., 2009)。

他のドーパミン D2 様受容体アゴニストにおいても、神経保護が確認されている。MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) は、グリア細胞において MPP⁺ に代謝された後、ドーパミン作動性ニューロンへ選択的に取り込まれ、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I を阻害する毒物であり、6-hydroxydopamine と同様に PD モデル動物の作成に用いられる。D2 様受容体アゴニストであるブロモクリプチン、プラミペキソール、タリペキソールをそれぞれ、1 日 1 回 20 日間 C57BL/6N マウスの腹腔内に投与すると、MPTP による神経脱落が抑制されることが報告されている (Kitamura et al., 1997)。in vitro においても、MPP⁺ による SH-SY5Y の細胞死が、ブロモクリプチン、プラミペキソール、およびタリペキソールの前処置により阻害されることが示されている (Kitamura et al., 1998)。

2-2-4. 黒質-線条体以外の脳部位におけるドーパミン D2 受容体アゴニストの薬理作用

これまで、カベルゴリンを含む D2 様受容体アゴニストの神経保護作用の解析は、主として、D2 受容体が高発現している黒質-線条体のニューロンや神経様細

胞株 (SH-SY5Y) を対象に行われてきた。しかし、D2 受容体は海馬や嗅皮質、扁桃体、大脳皮質など様々な部位に発現している (Jackson and Westlind-Danielsson., 1994)。このことから、カベルゴリンは様々な脳部位のニューロンに作用する可能性があると考えられる。例えば、先行研究において、1 日 1 回、14 日間カベルゴリンをラットに皮下投与すると、うつや不安様行動の減少が認められ、同時に、海馬の脳由来神経栄養因子 (BDNF) が増加することが報告されている (Chiba et al., 2010)。BDNF はシナプス可塑性やニューロンの生存、分化などに重要であり、記憶・学習や情動制御、抗うつ、抗不安作用などに関与する (Numakawa et al., 2013)。また、スナネズミの両側頸動脈閉塞による脳虚血モデルにおいて、D2 受容体アゴニストであるペルゴリド、ブロモクリプチン、リスリドを閉塞の 1 時間前に投与すると、海馬 CA1 領域における神経脱落が抑制された (O'Neill et al., 1998)。しかし、脳虚血や AD などで顕著な神経脱落が起きる大脳皮質において、カベルゴリンが有効な作用を発揮するのかどうかは不明であった。

大脳皮質ニューロンの脱落は、認知障害をはじめ様々な脳の高次機能障害を引き起こす。カベルゴリンによる大脳皮質ニューロンへの保護作用が明らかになれば、カベルゴリンが AD など、大脳皮質の神経脱落が生じる疾患の治療にも適応できる可能性がある。そこで本研究では、培養大脳皮質ニューロンを用いて、カベルゴリンの作用を酸化ストレスからの保護、という観点から明らかにすることを目的とした。

2-3. 実験方法

2-3-1. ラット大脳皮質ニューロンの初代培養

本研究は、動物実験倫理委員会（国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）の承認のもと、動物実験倫理委員会の指針に従って行った。実験には、Wistar rat の大脳皮質から作成した初代培養大脳皮質ニューロンを用いた。イソフルラン（Mylan, Tokyo, Japan）またはジエチルエーテル（Wako, Osaka, Japan）を生後 1-2 日の Wistar rat に吸入させた後、全脳を素早く取り出し、実体顕微鏡下で大脳皮質を単離した。大脳皮質をメスで細かく裁断した後、氷上の Leibovitz's L-15 Medium（Life Technologies, CA, USA）の中に移した。1400 rpm で 1 分間遠心分離を行い、上清を除去した。10 ml のパパイン溶液（9 units/ml のパパイン、200 units/ml の DNase I を含んだ Phosphate Buffered Saline（PBS）溶液）を加え、37°C で 20 分間振盪した。1400 rpm で 1 分間遠心分離を行い、上清を除いた後、10 ml の 5/5DF 培地（5 % のウシ胎児血清（FBS）、5 % のウマ血清、18 units/ml のペニシリンおよび 18 units/ml のストレプトマイシンを含んだ Dulbecco's Modified Eagle Medium と F-12 の 1:1 混合培地（DMEM/F-12））を加えた。ピペッティングにより細胞を懸濁した後、sterilizing filter（BD Falcon, CA, USA）により組織片を取り除いた。その後、1400 rpm で 5 分間遠心分離を行って上清を除き、5/5DF 培地で適切な細胞密度に希釈した。ポリエチルイミンによりコーティングを行った 3.5 cm ディッシュ（BD Falcon）、24 well プレート（BD Falcon）、48 well プレート（BD Falcon）、またはガラスボトムディッシュ（MATSUNAMI GLASS IND., LTD, Osaka, Japan）に、密度が 5×10^5 cells/cm² になるように細胞を播種した。培養細胞中に含まれるグリア細胞の影響を除くため、2 μ M のシタラビン（Sigma-Aldrich, MO, USA）を培養後 1 日目（DIV1）に添加した。細胞は 5% CO₂、37°C の条件下で 6-7 日間培養した後、実験に用いた。

2-3-2. 薬剤処理

カベルゴリンと AP5 は Tocris bioscience（Bristol, UK）より、H₂O₂、SP600125、KCl および L-グルタミン酸は Wako より購入した。またスピペロンは Abcam（Bristol, UK）、U0126 は Promega（WI, USA）、SB203580 は Millipore（MA, USA）、ニフェジピンは Sigma-Aldrich から入手した。

2-3-3. MTT assay

細胞の生存率を測定するために、MTT assay を行った。これは、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide（MTT）が生細胞におけるミトコンドリア活性により、ホルマザン色素へと代謝されることを利用している。MTT は黄色であるのに対し、ホルマザン色素は紫色であるため、比色法あるいは

は吸光度の比較を行うことで、細胞の生存率を測定することができる。48 well プレートで培養した細胞に薬剤処理を行った後、培地を MTT 培地 (MTT 溶液 (2.5 mg/ml の MTT を含む PBS 溶液) と DMEM/F-12 の 1:5 混合培地) に入れ替え、5% CO₂、37°C の条件下で 1.5-2.5 時間反応させた。その後、イソプロピルアルコールを含む SDS lysis buffer を加え、ピペッティングを行い、ホルマザン色素を溶解させた。各サンプルを 96 well プレートに移し、iMark Micro plate reader (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) により 570 nm の吸光度を測定した。各群の吸光度をコントロール群との百分率で表したものを細胞生存率とした。

2-3-4. Calcein assay

MTT assay による細胞生存率の解析に加えて、細胞生存率を Calcein assay によって測定した。Calcein assay は、生細胞内のエステラーゼにより Calcein-AM が Calcein に加水分解されることを利用している。Calcein-AM は細胞膜透過性をもつ非蛍光性の物質であるのに対し、Calcein は細胞膜非透過性で黄緑色蛍光を発する。生細胞に Calcein-AM を投与することで、Calcein が細胞内に集積するため、黄緑色蛍光を測定することで、細胞の生存率を評価できる。Calcein assay は Cell Counting Kit-F (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて行った。48 well プレートで培養した細胞に薬剤処理を行った後、PBS で 1 度洗浄し、PBS で 50 倍希釈した Cell Counting Kit-F Solution を加え、室温で 20 分間静置した。その後、PBS で数回洗浄し、蛍光強度 (485/535 nm) を 2030 ARVO X-2 Multilabel Reader (PerkinElmer Japan Co., Ltd., Kanagawa, Japan) により測定した。各群の蛍光強度をコントロール群との百分率で表したものを生存率とした。

2-3-5. 免疫染色

ニューロンの生存率を測定するため、ニューロンマーカーである Microtubule Associated Protein 2 (MAP2) の免疫染色を行った。ガラスボトムディッシュで培養した細胞に薬剤処理を行った後、冷えた PBS で洗浄し、細胞固定液 (4% のパラホルムアルデヒドを含む PBS 溶液) を加え、室温に 20 分間静置した。さらに PBS で一度洗浄した後、ブロッキング液 (10% の FBS と 0.5% の Triton-X を含む PBS 溶液) により、30 分間のブロッキングを行った。その後、MAP2 抗体 (Sigma-Aldrich, ブロッキング液により 500 倍希釈) に 4°C、Overnight (O.N.) で反応させた。PBS で 3 回洗浄し、Alexa Fluor 488 mouse IgG₁ 抗体 (Life Technologies, ブロッキング液により 200 倍希釈) に室温で 1 時間反応させた。さらに PBS で 3 回洗浄した後、Axio Observer Z1 fluorescence microscope (ZEISS, Germany) により免疫蛍光を観測した。各群の MAP2-陽性細胞数を計測し、コントロール群との百分率で表したものを生存率とした。

アポトーシスに伴う核凝縮を観測するため、Hoechst 33342 (Molecular Probes,

OR, USA) による核染色を行った。上記の過程と同様に、細胞の固定と PBS による洗浄を行った後、5 µg/ml の Hoechst 33342 (PBS で希釈) に室温で 15 分間反応させた。その後、PBS で洗浄し、Axio Observer Z1 fluorescence microscope により細胞核を観測した。各群の核凝縮数を計測し、コントロール群との百分率で表すことで核凝縮の頻度とした。

2-3-6. タンパク質抽出とウェスタンブロッティング

タンパク質の発現量の測定およびシグナル分子のリン酸化検出のため、ウェスタンブロッティング (WB) を行った。3.5 cm ディッシュで培養した細胞に薬剤処理を行った後、冷えた PBS で洗浄し、-20°C で保管した。細胞をリシスバッファ (1% Sodium dodecyl sulfate (SDS)、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM EDTA (pH 8.0)、10 mM NaF、2 mM Na₃VO₄ および 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含む水溶液) で溶解した後、100°C で 5 分間熱処理し、ソニケーションを行った。15000 rpm で 30 分間遠心分離を行い、上清を回収した。上清のタンパク質濃度を BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) により計測し、各サンプルのタンパク質濃度が等しくなるようにリシスバッファで希釈した。上清の 1/4 量のサンプルバッファ (50% glycerol、0.325 M Tris-HCl (pH 6.8)、15% SDS、12.5% 2-mercaptoethanol、0.125 mg/ml Bromophenol blue) を加え、再び 100°C で 5 分間熱処理したサンプルを SDS-PAGE に用いた。

等量のサンプルを 8 or 10% のアクリルアミドゲルで電気泳動した後、Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) を用いて、ゲル上のタンパク質を polyvinylidene difluoride メンブレンに転写した。メンブレンを 5% の脱脂粉乳 (Tris Buffered Saline (TBS) により希釈) により 1 時間のブロッキングを行い、1 次抗体 (1% の脱脂粉乳により希釈) を 4°C、O.N. で反応させた。その後、TBS により 3 回の洗浄を行い、2 次抗体 (1% の脱脂粉乳により希釈) を室温で 1 時間反応させた。さらに、TBS による洗浄を 3 回を行い、ImmunoStar Reagents (Wako) により発色を行った。発色したメンブレンは X 線フィルム (GE Healthcare, WI, USA) もしくは EZ capture II/ST (ATTO, Tokyo, Japan) により可視化した。タンパク質量を表す各バンドの強度は Lane & Spot Analyzer software (ATTO) により定量した。1 次抗体には以下の抗体を使用した。Dopamine D2 receptor 抗体 (Millipore, 500 倍希釈)、synapsin I 抗体 (Millipore, 1000 倍希釈)、pERK 抗体 (Cell Signaling, MA, USA, 1000 倍希釈)、ERK 抗体 (Cell Signaling, 1000 倍希釈)、pJNK 抗体 (Cell Signaling, 1000 倍希釈)、JNK 抗体 (Cell Signaling, 1000 倍希釈)、pp38 抗体 (Cell Signaling, 1000 倍希釈)、p38 抗体 (Cell Signaling, 500 倍希釈)、NR2A 抗体 (Sigma Aldrich, total: 500 倍希釈, cell surface: 200 倍希釈)、NR2B 抗体 (Sigma-Aldrich, total: 500 倍希釈, cell surface: 200 倍希釈)、GluR1 抗体 (Millipore, 500 倍希釈)、GluR2/3 抗体 (Millipore, 500 倍希釈)、EAAC1 抗体

(Alpha Diagnostic International, TX, USA, 1000 倍希釈)、GLT-1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA, 500 倍希釈)、 β -Actin 抗体 (Sigma-Aldrich, 5000 倍希釈)。2 次抗体として、以下の抗体を使用した。Rabbit IgG Secondary Antibody Peroxidase Conjugated Properties (Rockland Immunochemicals Inc., PA, USA)、Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Labs Inc., PA, USA)。

2-3-7. 細胞膜上タンパク質の抽出

細胞膜に存在するグルタミン酸受容体を検出するため、膜タンパク質の標識と免疫沈降を行った。3.5 cm ディッシュで培養した細胞に薬剤を処理した後、冷えた PBS で 3 回洗浄し、Sulfo-NHL-LC-Biotin (Thermo Fisher Scientific, PBS で希釈) に氷上で 30 分間反応させた。その後冷えた 100 mM のグリシン溶液 (PBS で希釈) で 3 回洗浄し、 -20°C で保管した。氷上で、細胞を RIPA リシスバッファ (1% Triton X100, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 および 1 mM PMSF を含む水溶液) により溶解した後、溶解液を 4°C で 3 時間、回転させた。15000 rpm、 4°C で 30 分間遠心分離した後、上清を回収し、BCA Protein Assay Kit によりタンパク質量を測定した。各サンプルから等量のタンパク質を UltraLink Immobilized NeutrAvidin Protein Plus conjugated with agarose beads (Thermo Fisher Scientific) に加え、 4°C 、O.N. で反応させた。5000 rpm 4°C で 5 分間遠心分離を行い、上清を取り除いた。ビーズを 3 回 RIPA リシスバッファで洗浄した後、 100°C で 5 分間熱処理し、RIPA リシスバッファにタンパク質を溶出させた。その後、サンプルに 1/4 量のサンプルバッファを加えたものを SDS-PAGE に用いた。

2-3-8. 細胞外グルタミン酸の測定

H_2O_2 による細胞外グルタミン酸の上昇を測定した。24 well プレートで培養した細胞に薬剤を処理した後、KRH バッファ (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM NaH_2PO_4 , 1.8 mM CaCl_2 , 10 mM グルコース, 1 % Bovine serum albumin および 25 mM HEPES (pH 7.4) を含む水溶液) で 3 回洗浄した。その後、KRH バッファを加え、20 分後に細胞外液を回収し、 H_2O_2 刺激前のサンプルとした。さらに新しい KRH バッファと共に $50\text{ }\mu\text{M}$ の H_2O_2 を加え、20 分後に細胞外液を回収し、 H_2O_2 刺激後のサンプルとした。各サンプル中のグルタミン酸は High performance liquid chromatography (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) により測定した。

2-3-9. RNA 抽出、逆転写反応、Real-time PCR

細胞内の RNA 量を測定した。24 well プレートで培養した細胞を薬剤により処理した後、mirVana miRNA Isolation Kit (Life Technologies) を用いて、RNA の抽

出を行った。抽出した RNA の濃度は Nano Drop-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) により測定し、各サンプルから等量の RNA を SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Life Technologies) を用いて逆転写 PCR (25°Cで 10 分間、42°Cで 60 分間、85°Cで 5 分間、4°Cで反応終了) を行った。生成した cDNA と TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies) のプライマーを用いて、Real-time PCR (50°Cで 2 分間、95°Cで 10 分間した後 95°Cで 15 秒間、60°Cで 1 分間を 40 サイクル) による蛍光を ABI Prism 7000 (Life Technologies) により検出した。使用したプライマーは以下の通り。BDNF プライマー (Rn02531967)、Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase プライマー (GAPDH、4352338E)。

2-3-10. 統計処理

すべてのグラフは平均値±標準偏差で表した。統計的有意差の検定には、2 群間比較の場合 T-test を、多群比較の場合 ANOVA 検定 (SPSS Japan, Tokyo, Japan) と Bonferroni-test (多重比較検定) を行った。P 値が 0.05 以下の場合、統計的に有意と判断した。

2-4. 実験結果

2-4-1. H₂O₂ 曝露は神経細胞死を誘導する

酸化ストレスを発生させる H₂O₂ による細胞死を確認するため、培養大脳皮質ニューロンに 1-100 μ M の H₂O₂ を投与し、細胞の生存率を測定した。生存率の測定には 3 つの手法 (MTT assay、MAP2 陽性細胞数の計測、および Calcein assay) を用いた。いずれの測定法においても、50 μ M 以上の H₂O₂ 曝露が神経細胞死を誘導することが分かった (Fig. 2-1A)。以降の実験では、細胞死の誘導に 50 μ M の H₂O₂ を用いた。また特に記述のない限り、生存率測定は MTT assay により行った。

2-4-2. カベルゴリンは用量および前処置時間依存的に神経細胞死を抑制する

カベルゴリンが大脳皮質ニューロンに対して保護作用を発揮するか調べるため、0.01-50 μ M のカベルゴリンを投与し、その 24 時間後に H₂O₂ 曝露を行った。カベルゴリンは 1 μ M 以上の濃度において用量依存的に神経細胞死を抑制した (Fig. 2-1B)。以降の実験では、10 μ M のカベルゴリンを投与している。

続いて、カベルゴリンが神経保護作用を発揮するのに必要な前処置時間を調べた。H₂O₂ を投与する 0-24 時間前にカベルゴリンを前処置し、生存率を測定した。カベルゴリンは 9 時間以上前に投与された場合にのみ、神経細胞死を抑制した (Fig. 2-1C)。以降の実験では、カベルゴリンを H₂O₂ 曝露の 24 時間前に投与している。

さらにカベルゴリンの神経保護作用を MAP2 染色により確認した。H₂O₂ 投与群では、神経細胞数の減少と樹状突起の退縮が起きているのに対し、カベルゴリンを前処置した群では、そのような神経細胞の変性や脱落が抑制された (Fig. 2-1D, E)。

2-4-3. カベルゴリンは酸化ストレスによるアポトーシスの誘導を抑制する

酸化ストレスによる神経細胞死にはネクローシスとアポトーシスの 2 種類がある。カベルゴリンがアポトーシスを抑制しているのか調べるため、アポトーシスに特有の細胞核の凝縮を観察した。カベルゴリンは H₂O₂ による核凝縮の増加を抑制した (Fig. 2-1F, G)。

Figure 2-1

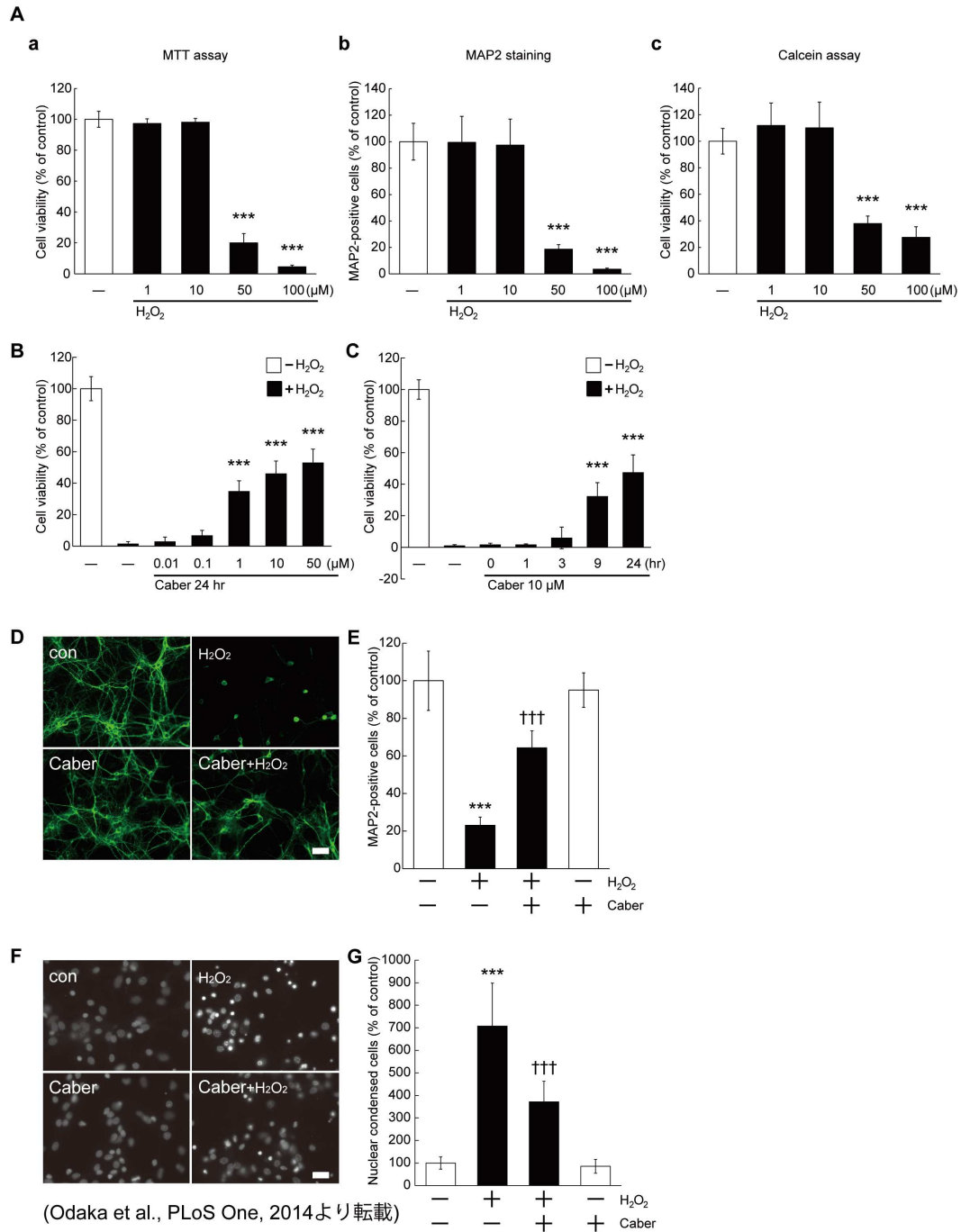


Figure 2-1. カベルゴリンは脳皮質ニューロンを酸化ストレスから保護する

(A) DIV 7-8 の培養脳皮質ニューロンに対し 1-100 μM の H_2O_2 を投与した。投与後 9-12 時間後に細胞の生存率を MTT assay (a)、MAP2 染色 (b)、Calcein assay (c) により計測した。a: $n=7-16$ 、b: $n=24$ 、c: $n=7-14$ 、*** <0.001 vs - H_2O_2 (one-way ANOVA) (B) DIV 6-7 の培養ニューロンに対し、0.01-50 μM のカベルゴリンを投与した。投与から 24 時間後に 50 μM の H_2O_2 を投与し、さらに 9-12 時間後の生存率を測定した。Caber: カベルゴリン、 $n=5-12$ 、*** <0.001 vs + H_2O_2 - Caber (two-way ANOVA) (C) 50 μM の H_2O_2 を

投与する 0-24 時間前に 10 μ M のカベルゴリンを投与した。H₂O₂ 投与の 9-12 時間後に生存率の測定を行った。n=4-12、***<0.001 vs + H₂O₂ - Caber (two-way ANOVA) (D) 10 μ M のカベルゴリンを投与し、24 時間後に 50 μ M の H₂O₂ を投与した。9-12 時間後に細胞を固定し、MAP2 抗体による免疫染色を行った。Con: コントロール、スケールバー: 50 μ m (E) MAP2-陽性細胞数の定量データを示した。n=12、***<0.001 vs - H₂O₂ - Caber (two-way ANOVA) †††<0.001 vs + H₂O₂ - Caber (two-way ANOVA) (F) H₂O₂ (50 μ M) 投与の 24 時間前にカベルゴリン (10 μ M) を前処置した。Hoechst 33342 による核染色を行い、核凝縮を観察した。スケールバー: 25 μ m (G) 核凝縮をおこした細胞数の定量データを示した。n=15、***<0.001 vs - H₂O₂ - Caber (two-way ANOVA) †††<0.001 vs + H₂O₂ - Caber (two-way ANOVA)

2-4-4. カベルゴリンはドーパミン D2 受容体刺激を介して神経保護作用を発揮する

カベルゴリンの神経保護作用におけるドーパミン D2 受容体の関与を調べるため、DIV 4-11 の大脳皮質ニューロンにおける D2 受容体の発現を確認した。ドーパミン D2 受容体の発現は DIV 4 において最も低く、DIV 6-11 では同程度に発現していた (Fig. 2-2Aa)。DIV 4-11 におけるシナプス関連タンパク質 synapsin I の発現上昇をポジティブコントロールとして示した (Fig. 2-2Ab)。さらにドーパミン D2 受容体アンタゴニストであるスピペロンを用いて、阻害実験を行った。スピペロン (10 μ M) をカベルゴリン投与の 20 分前に前処置すると、カベルゴリンによる細胞死抑制が阻害された (Fig. 2-2B)。

Figure 2-2

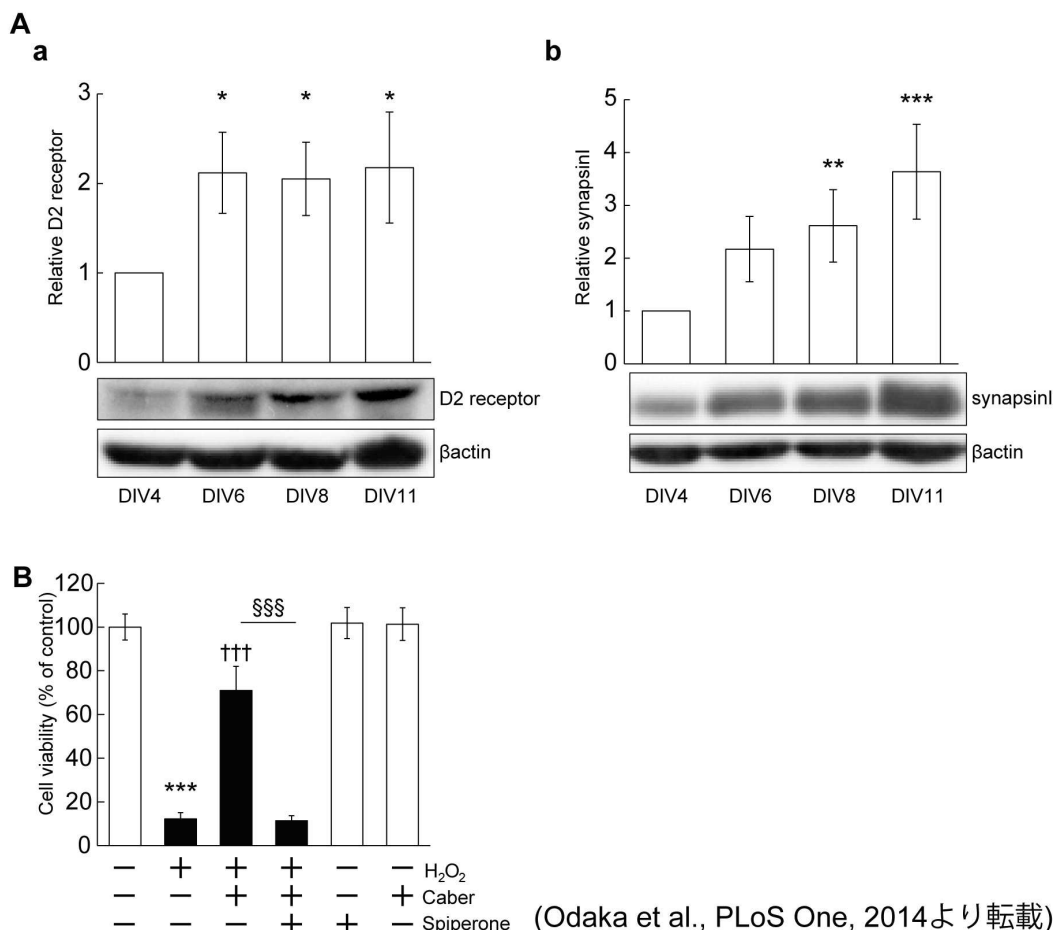


Figure 2-2. カベルゴリンの神経保護作用におけるドーパミン D2 受容体の関与

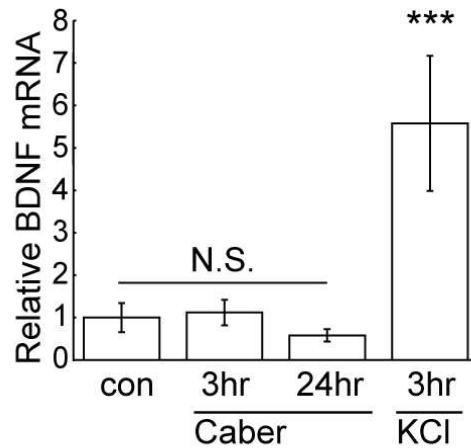
(A) a: DIV 4-11 の培養大脳皮質ニューロンにおけるドーパミン D2 受容体の発現量を WB により調べた。n=4、* <0.05 vs DIV 4 (one-way ANOVA)、b: DIV 依存的なシナプス成熟のポジティブコントロールとして synapsin I (シナプス関連タンパク質) の発現を示した。n=5、** <0.01 vs DIV 4、*** <0.001 vs DIV 4 (one-way ANOVA) (B) カベルゴリンの投与 20 分前にスピペロンを投与した。n=6-12、*** <0.001 vs - H₂O₂ - Caber - Spiroperone、††† <0.001 vs + H₂O₂ - Caber - Spiroperone (three-way ANOVA)

2-4-5. カベルゴリンの投与は大脳皮質ニューロンの BDNF 発現に影響しない

先行研究において、カベルゴリンの投与がラットの海馬の BDNF 発現を増加させることを報告されている (Chiba et al., 2010)。BDNF は神経保護作用を持つことが知られているので、カベルゴリンの投与が培養大脳皮質ニューロンの BDNF 発現を増加させるか検証を行った。BDNF は神経活動の活性化に伴い発現が上昇することが知られているため、ポジティブコントロールとして KCl による脱分極刺激を与えた。その結果、KCl の投与は BDNF の発現を上昇させているのに

対し、カベルゴリンの投与後 3、24 時間において、BDNF の発現に変化は認められなかった (Fig. 2-3)。

Figure 2-3



(Odaka et al., PLoS One, 2014より転載)

Figure 2-3. カベルゴリンは脳皮質ニューロンの BDNF 発現に影響しない

カベルゴリン (10 μ M) を 3 もしくは 24 時間処置した。またポジティブコントロールとして KCl (50 mM) の 3 時間曝露を行った。Real-time PCR により BDNF mRNA を測定し、定量には GAPDH の発現量で標準化した。n=6、***<0.001 vs con (two-way ANOVA)

2-4-6. H₂O₂ 曝露は ERK、p38 シグナルを活性化させ、細胞死を誘導する

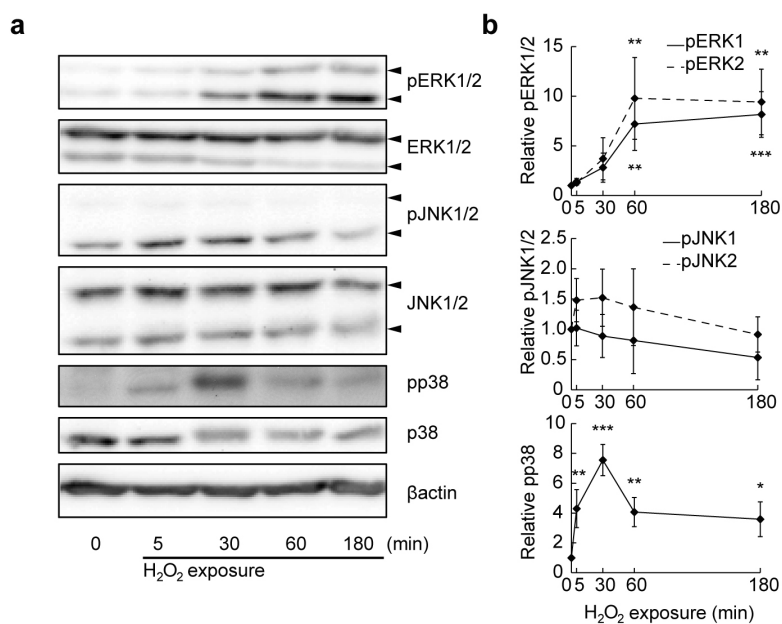
酸化ストレスによるアポトーシスの誘導には、Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) シグナルの活性化が関与している。カベルゴリンが酸化ストレスによるアポトーシスを抑制したことから、H₂O₂ による 3 つの MAPK シグナル、Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) シグナル経路、c-jun N-terminal kinase (JNK) シグナル経路、および p38 MAPK (p38) シグナル経路の活性化 (リン酸化) を解析した。H₂O₂ の投与 1 時間後、ERK 1/2 においては有意な活性上昇が観察され、3 時間後も高い活性が維持されていた (Fig. 2-4A)。p38 は H₂O₂ 曝露後、5 分で活性化し、30 分後において最も高い活性を示した (Fig. 2-4A)。一方 JNK 1/2 は有意な活性上昇を示さなかった (Fig. 2-4A)。

続いて、各シグナル経路に対する特異的な阻害剤を用いて、H₂O₂ による細胞死誘導への関与を検証した。ERK 1/2 の上流キナーゼ (MAPKK) のキナーゼ活性を阻害する U0126 は、用量依存的に H₂O₂ による神経細胞死を抑制した (Fig. 2-4Ba)。10 μ M の U0126 は ERK シグナルのリン酸化をほぼ完全に抑制することを確認した (Fig. 2-4Bb)。p38 のキナーゼ活性を阻害する SB203580 は、用量依存的に神経細胞死を抑制した (Fig. 2-4Bc)。一方、JNK 1/2 のキナーゼ活性を阻

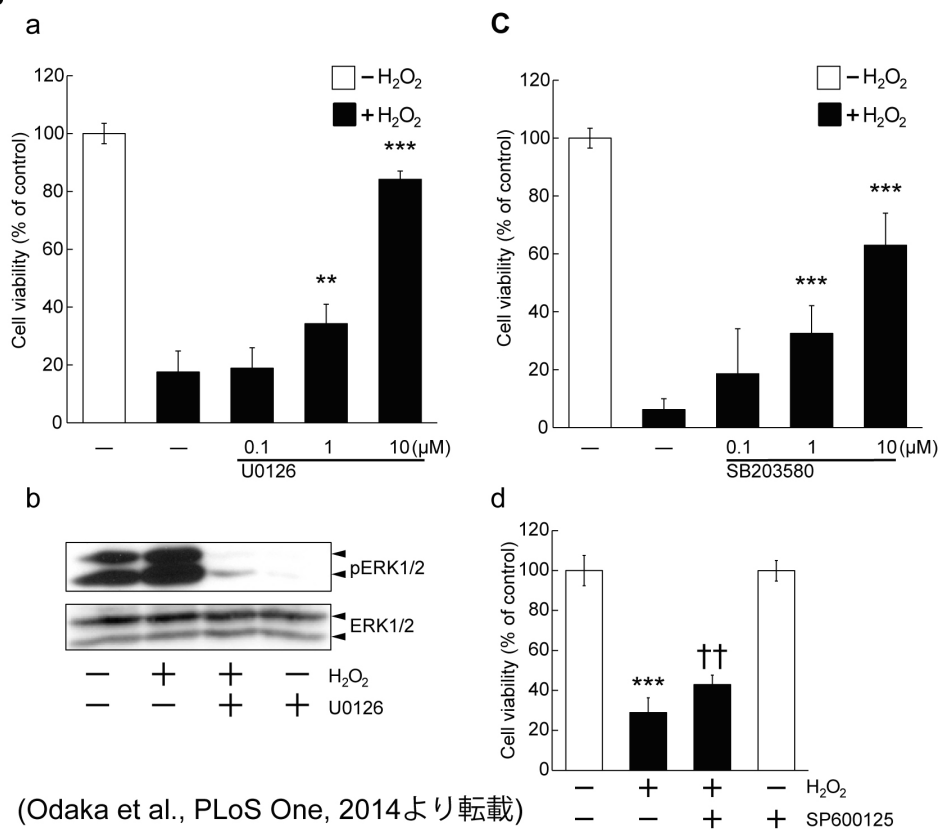
害する SP600125 による神経保護作用は、限定的だった (Fig. 2-4Bd)。

Figure 2-4

A



B



(Odaka et al., PLoS One, 2014より転載)

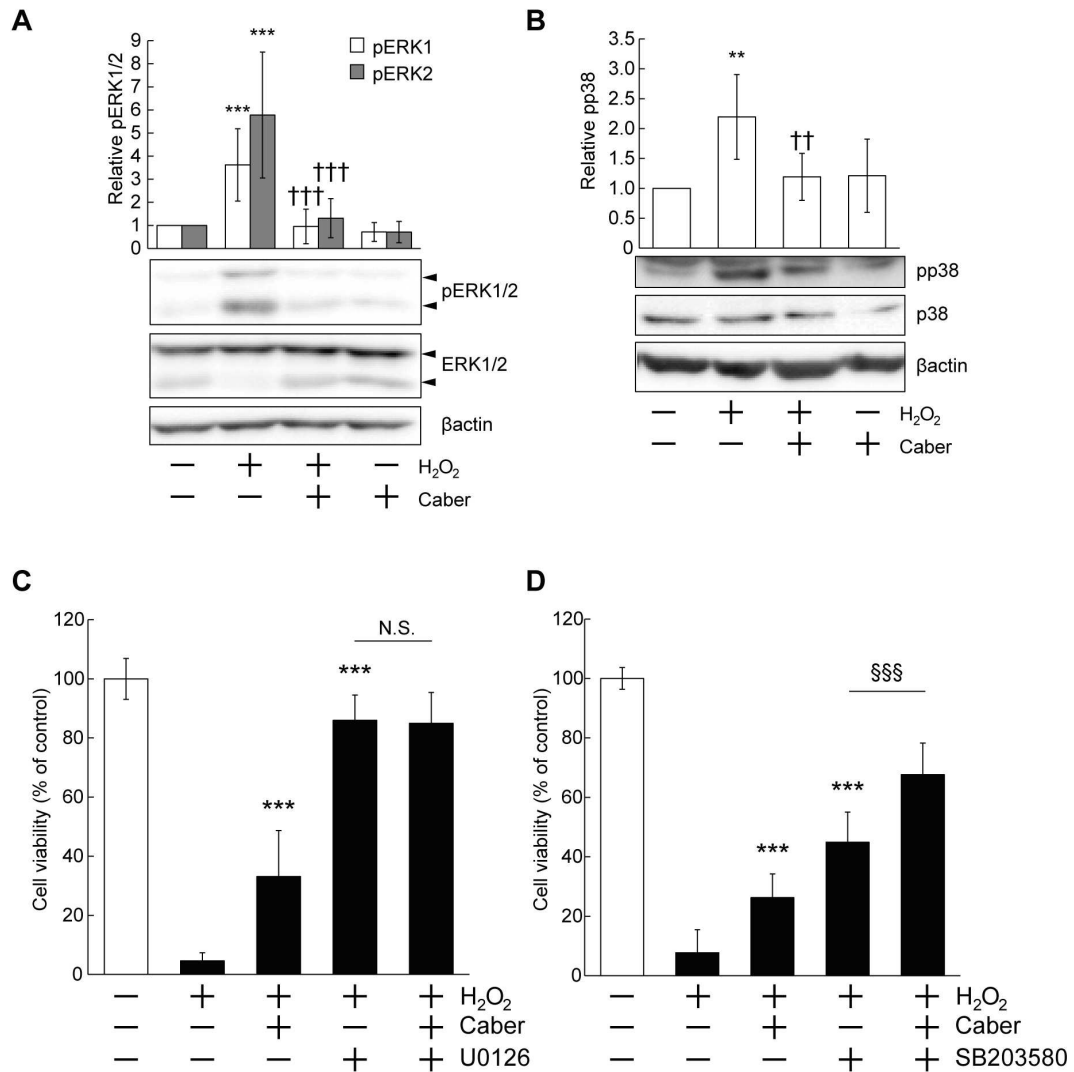
Figure 2-4. H_2O_2 による MAPK シグナルの活性化と細胞死の誘導

(A) a:培養大脳皮質ニューロンに H_2O_2 (50 μ M) を投与した。投与後 5、30、60、180

分におけるリン酸化 ERK 1/2 (pERK 1/2)、リン酸化 JNK 1/2 (pJNK 1/2)、リン酸化 p38 (pp38) の存在量を WB により測定した。その後、メンブレンのストリッピングを行い、ERK、JNK、p38 抗体をリブロットし、目的タンパク質の全量を検出した。b: pERK 1/2、pJNK 1/2、pp38 の定量データをグラフに示した。n=4、***<0.001、**<0.01、*<0.05 vs 0 min (one-way ANOVA) (B) a: 0.1-10 μ M の U0126 (ERK シグナル阻害剤) を投与し、20 分後に H_2O_2 曝露を行った。9-12 時間後に MTT assay を行い、細胞の生存率を測定した。n=4、***<0.001、**<0.01 vs + H_2O_2 - U0126 (two-way ANOVA) b: 10 μ M の U0126 を H_2O_2 曝露の 20 分前に投与し、曝露後 1 時間における ERK のリン酸化を WB で検出した。U0126 投与群におけるバンドを確認するため、Figure 2-4Aa より長く露光を行っている。その後、メンブレンのストリッピングを行い、ERK 抗体をリブロットし WB により測定した。c: 0.1-10 μ M の SB203580 (p38 シグナル阻害剤) を H_2O_2 曝露の 20 分前に投与し、細胞生存率への影響を調べた。n=8、***<0.001 vs + H_2O_2 - SB203580 (two-way ANOVA) d: 5 μ M の SP600125 (JNK シグナル阻害剤) を 20 分前に処置した後、 H_2O_2 を投与した。9-12 時間後に、細胞の生存率を測定した。n=6、***<0.001 vs - H_2O_2 - SP600125、††<0.01 vs + H_2O_2 - SP600125 (two-way ANOVA)

2-4-7. カベルゴリンは H_2O_2 曝露による ERK 1/2、p38 の活性化を阻害する
カベルゴリンが、 H_2O_2 による ERK 1/2 や p38 の活性化に与える影響を解析した。カベルゴリンの前処置は、 H_2O_2 による ERK 1/2、および p38 の活性化を有意に抑制した (Fig. 2-5A、B)。カベルゴリンによる ERK 1/2 の抑制作用と p38 の抑制作用のどちらがより神経保護に寄与しているか検証するため、カベルゴリンと各シグナル阻害剤の共投与実験を行った。カベルゴリンと U0126 の共投与は U0126 の単独投与に比べ、相加作用を示さなかった (Fig. 2-5C)。一方、カベルゴリンと SB203580 の共投与は、相加作用を示した (Fig. 2-5D)。このことから ERK 1/2 の抑制作用がより神経保護に寄与していると考えられる。

Figure 2-5



(Odaka et al., PLoS One, 2014より転載)

Figure 2-5. カベルゴリンが ERK 1/2 および p38 の活性化に与える影響

(A) (B) カベルゴリン (10 μ M) の投与 24 時間後に、H₂O₂ を投与した。ERK 1/2 のリン酸化を H₂O₂ 投与の 60 分後に、p38 のリン酸化を H₂O₂ 投与の 30 分後に解析した。その後、メンブレンのストリッピングを行い、ERK および p38 抗体をリブロットし、トータルフォームを検出した。pERK 1/2: n=7、pp38: n=5、***<0.001、**<0.01 vs - H₂O₂ - caber、†††<0.001、††<0.01 vs + H₂O₂ - caber (two-way ANOVA) (C) (D) H₂O₂ 曝露の 24 時間前にカベルゴリンを、20 分前に U0126 もしくは SB203580 を前処置した。H₂O₂ に 9-12 時間曝露した後、細胞の生存率を測定した。U0126: n=9-12、***<0.001 vs + H₂O₂ - caber - U0126 (three-way ANOVA)、SB203580: n=9-12、***<0.001 vs + H₂O₂ - caber - SB203580 (three-way ANOVA)

2-4-8. H₂O₂ 曝露は脳皮質ニューロンの興奮毒性を引き起こす

グルタミン酸はニューロン間の情報伝達に必須な興奮性神経伝達物質だが、細胞外に過剰量存在すると、細胞外 Ca^{2+} の過剰流入を誘発し、神経細胞死を引き起こす (Choi., 1995)。酸化ストレスは、グルタミン酸の細胞外蓄積を引き起こし、細胞内シグナルの活性化や細胞死を誘導することが示唆されている (Mailly et al., 1999; Lee et al., 2004)。そこで、 H_2O_2 曝露における興奮毒性の関与を検証した。まず、高濃度のグルタミン酸投与は、用量依存的に神経細胞死を誘導することを確認した (Fig. 2-6A)。また、NMDA 型グルタミン酸受容体の阻害剤である AP5 は、 H_2O_2 曝露による神経細胞死を抑制した (Fig. 2-6B)。電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの阻害剤であるニフェジピンも H_2O_2 曝露による細胞死の誘導を阻害した (Fig. 2-6C)。

Figure 2-6

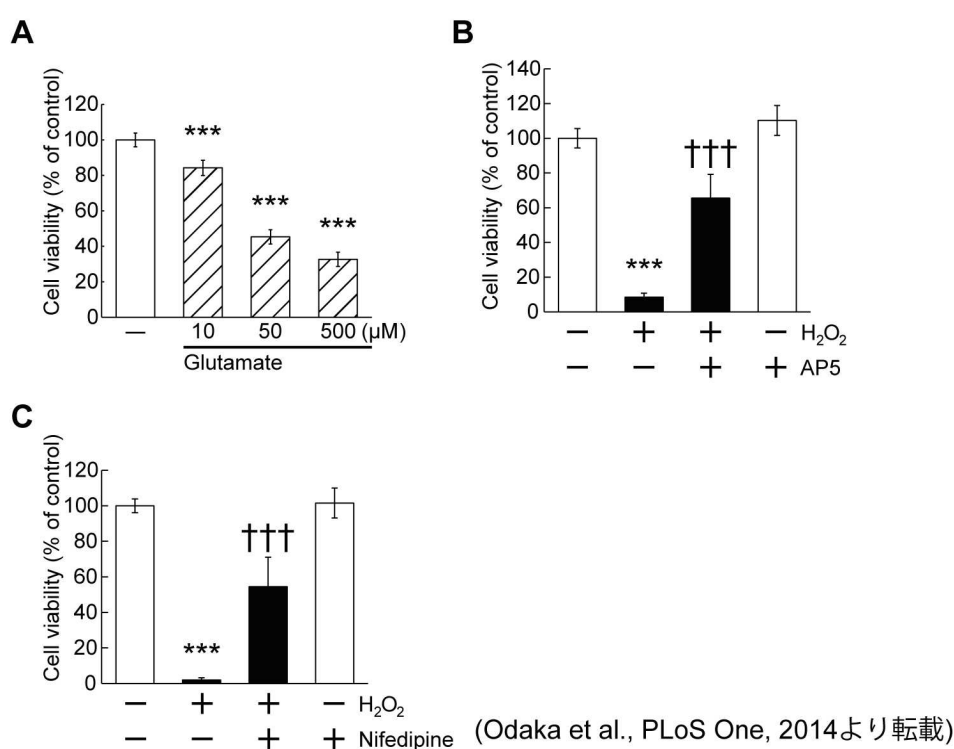


Figure 2-6. 酸化ストレスによるグルタミン酸毒性の誘導

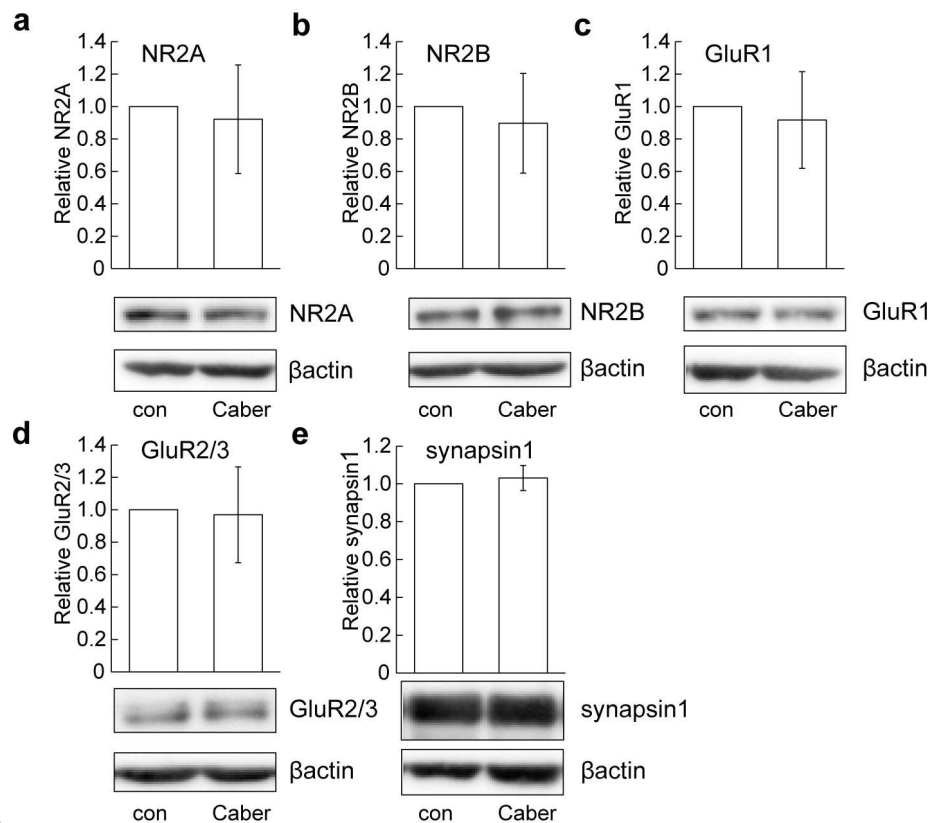
(A) DIV7-8 の大脳皮質ニューロンに 10-500 μM のグルタミン酸を投与した。24 時間後に MTT assay を行い、細胞の生存率を測定した。n=8、***<0.001 vs - glutamate (one-way ANOVA) (B) (C) AP5 (10 μM 、NMDA 型グルタミン酸受容体阻害剤) またはニフェジピン (10 μM 、電位依存性 Ca^{2+} チャンネル阻害剤) の投与 20 分後に H_2O_2 を投与した。9-12 時間後、細胞の生存率を測定した。AP5: n=6-12、***<0.001 vs - H_2O_2 - AP5、†††<0.001 vs + H_2O_2 - AP5 (two-way ANOVA)、ニフェジピン: n=6-12、***<0.001 vs - H_2O_2 - Nifedipine、†††<0.001 vs + H_2O_2 - Nifedipine (two-way ANOVA)

2-4-9. カベルゴリンはグルタミン酸受容体の発現に影響しない

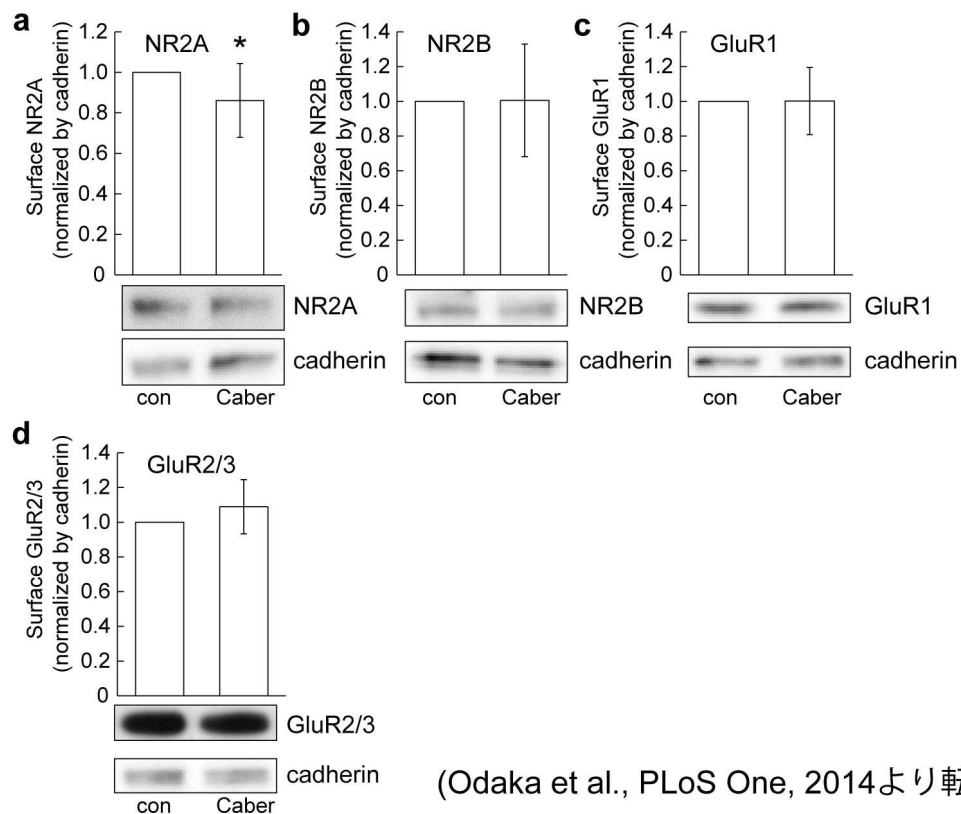
次に、カベルゴリンが H_2O_2 による過興奮毒性の誘導を抑制する可能性を検証した。グルタミン酸受容体の発現減少は、興奮毒性に対し抵抗性を与えることが報告されている (Lee et al., 2004; Resink et al., 1995)。そこで、カベルゴリンがグルタミン酸受容体の発現に影響を与えるか検証した。カベルゴリンは、AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットである GluR1、GluR2/3、NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニットである NR2A、NR2B、そしてプレシナプスマーカーであるシナプシン 1 の発現量に影響を与えなかった (Fig. 2-7A)。さらに、細胞膜に局在するグルタミン酸受容体の発現量に着目したところ、NR2A においてのみ、僅かな減少が認められたが、NR2B、GluR1、GluR2/3 では影響がみられなかった (Fig. 2-7B)。

Figure 2-7

A



B



(Odaka et al., PLoS One, 2014より転載)

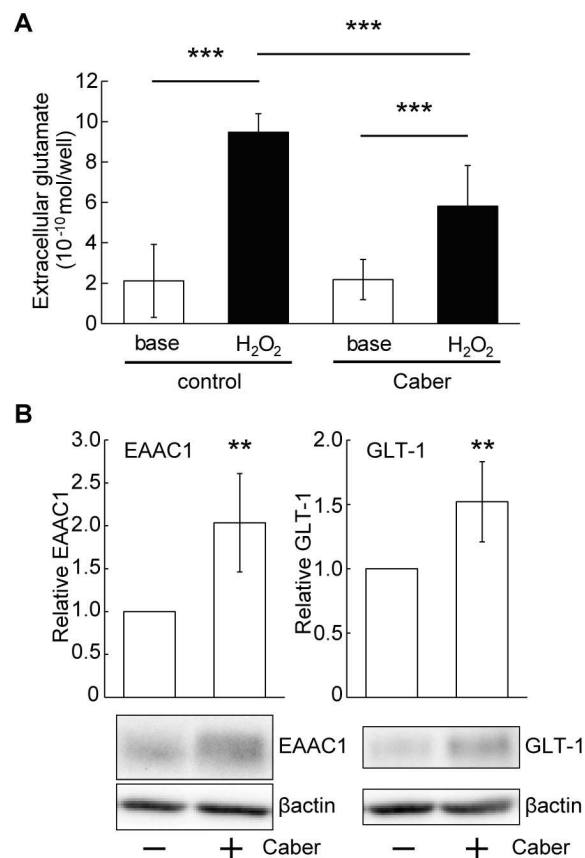
Figure 2-7. カベルゴリンはグルタミン酸受容体の発現に影響しない

(A) DIV6-7 の大脳皮質ニューロンにカベルゴリンを 24 時間処置し、グルタミン酸受容体サブユニット (GluR1、GluR2/3、NR2A、NR2B) およびプレシナプスマーカー (synapsin1) の発現量を WB で測定した。All protein: n=8 (t-test) (B) カベルゴリンを 24 時間処置し、細胞膜上のグルタミン酸受容体サブユニット (GluR1、GluR2/3、NR2A、NR2B) の存在量を WB で測定した。NR2A: n=9、* <0.05 vs con (t-test)、NR2B: n=6 (t-test)、GluR1: n=8 (t-test)、GluR2/3: n=8 (t-test)

2-4-10. カベルゴリンは H_2O_2 曝露が引き起こす細胞外グルタミン酸の蓄積を阻害する

続いて、カベルゴリンが酸化ストレスによる細胞外グルタミン酸の濃度上昇に影響するか検証した。control 群では、 H_2O_2 の曝露によりグルタミン酸の上昇がみられるのに対し、カベルゴリンを 24 時間処置した群では、 H_2O_2 によるグルタミン酸の上昇が有意に抑制された (Fig. 2-8A)。

Figure 2-8



(Odaka et al., PLoS One, 2014より転載)

Figure 2-8. カベルゴリンは H_2O_2 による細胞外グルタミン酸の濃度上昇を抑制する

(A) DIV6-7 の大脳皮質ニューロンにカベルゴリンを処置した。24 時間後に培地を KRH バッファに交換し、20 分後にバッファを回収して base のサンプルとした。その後 H_2O_2 を含む KRH バッファを加え、20 分後に回収し、 H_2O_2 曝露後のサンプルとした。サンプル中のグルタミン酸量を HPLC により計測した。n=12、***<0.001 (two-way ANOVA) (B) カベルゴリン投与後 24 時間時点におけるグルタミン酸トランスポーター (EAAC1、GLT-1) の発現量を WB で計測した。EAAC1: n=6、**<0.01 (t-test)、GLT-1: n=5、**<0.01 (t-test)

2-4-11. カベルゴリンはグルタミン酸トランスポーターの発現を上昇させる

細胞外のグルタミン酸濃度を適切に保つには、ニューロンおよびグリア細胞に発現しているグルタミン酸トランスポーターが、グルタミン酸を細胞内に再取り込みするシステムが重要である。カベルゴリンによるグルタミン酸トランスポーターの発現への影響を調べたところ、カベルゴリンを 24 時間処置した群では、グルタミン酸トランスポーターの発現が有意に上昇していた (Fig. 2-8B)。

2-5. 考察

2-5-1. カベルゴリンの神経保護作用とドーパミン D2 受容体

カベルゴリンを含む麦角系ドーパミン D2 様受容体アゴニストは、活性酸素種を直接還元するラジカルスカベンジャーとして作用することが知られている

(Yoshioka et al., 2002; Miglio et al., 2004; Lombardi et al., 2002)。D2 受容体刺激と、ラジカルスカベンジャー作用のどちらがカベルゴリンの神経保護作用に重要なのかに関しては議論がわかれており、一致した見解は得られていない。例えば、SH-SY5Y を用いた *in vitro* の系では、酸化ストレスに対するカベルゴリンの保護作用が、D2 受容体アンタゴニスト（ハロペリドール）に阻害されないと報告されている (Lombardi et al., 2002)。一方、ICR マウスにカベルゴリンを腹腔内投与した際、黒質と線条体でみられる神経保護作用はハロペリドールにより阻害された (Yoshioka et al., 2002)。本研究で私は、酸化ストレスによる大脳皮質ニューロンの細胞死をカベルゴリンが抑制することを見出した。カベルゴリンによる神経保護作用は D2 受容体アンタゴニストであるスピペロンにより完全に阻害されたことから、大脳皮質ニューロンにおける神経保護作用には、D2 受容体の活性化が必要であると思われる (Fig. 2-2B)。また、ラジカルスカベンジャー効果は通常、投与後直ちに効果を発揮するとされているが、今回、カベルゴリンが神経保護作用を発揮するのには、9 時間以上の前処置が必要であった。この結果は、ラジカルスカベンジャー以外の効果が、カベルゴリンによる神経保護に寄与していることを示唆している (Fig. 2-1C)。本研究においてカベルゴリンによる神経保護作用の新たなメカニズムとして示唆された過興奮毒性の抑制作用は、酸化ストレス曝露により細胞外グルタミン酸の蓄積を生じるグルタミン酸作動性ニューロンにおいてのみ生じる現象である。このため、グルタミン酸作動性ニューロンの豊富な大脳皮質ニューロンにおける保護作用とドーパミンニューロンや GABA 作動性ニューロンが豊富な黒質-線条体系における保護作用は異なる機序によるものである可能性が高い。このように D2 受容体アゴニストの神経保護のメカニズムは、各細胞種の D2 受容体への依存性や特性により異なるものと考えられる。

2-5-2. カベルゴリンと BDNF

先行研究において、カベルゴリンの長期投与により、ラットの海馬における BDNF 量が増加することが報告されている (Chiba et al., 2010)。BDNF は神経保護作用をもつことで知られているため、今回の *in vitro* 系においても BDNF 発現への影響を解析した。カベルゴリンの投与 3、および 24 時間後の BDNF 量を測定したが、有意な上昇はみられなかった (Fig. 2-3)。本研究で BDNF の増加がみられなかった理由として、神経細胞種や、投与時間、実験系（動个体レベル、お

よび分散細胞系)の違いなどが考えられる。特に生体において、薬剤を長期間投与すると、ネットワークレベルでの適応が起こり、二次的な作用を生む可能性がある。個体レベルでの長期的なカベルゴリン投与による BDNF レベルの上昇もそうした二次的な作用の 1 つである可能性が考えられる。

2-5-3. 酸化ストレスと MAPK カスケードの活性化

MAPK カスケードは主として、ERK、JNK、および p38 経路の 3 経路により構成される。様々な細胞外刺激によって活性化され、基質のセリン/スレオニン残基をリン酸化し、細胞の生存や死を含む様々な機能に関与している (Johnson and Lapadat., 2002; Irving and Bamford., 2002)。酸化ストレスによる MAPK カスケードの活性化は、アポトーシスを誘導するとされるが、いずれの経路を介してアポトーシスを誘導するかは、細胞種により異なる。大脳皮質ニューロンへの H_2O_2 の曝露は、ERK および p38 シグナルを活性化させる。一方で、JNK シグナルは有意な活性上昇を示さなかった (Fig. 2-4A)。十分量の ERK シグナル阻害剤

(U0126) と p38 シグナル阻害剤 (SB203580) が、 H_2O_2 曝露に対し高い神経保護作用を示したのに対し、JNK シグナル阻害剤 (SP600125) による保護作用は限定的であった (Fig. 2-4B)。培養大脳皮質ニューロンを用いた先行研究においても、 H_2O_2 が JNK をリン酸化させるには 1 mM 程度の濃度が必要であり、100 μM ではリン酸化がみられなかったことが報告されている (Crossthwaite et al., 2002)。今回、私が用いた 50 μM の H_2O_2 は JNK シグナルを活性化するには不十分であったと考えられる。

2-5-4. カベルゴリンと MAPK シグナル

カベルゴリンは H_2O_2 による ERK、および p38 シグナルの活性化を抑制した (Fig. 2-5A、B)。さらに ERK シグナル阻害と p38 シグナル阻害のどちらがより神経保護作用に寄与しているか調べるため、共投与実験を行った。もし ERK と p38 シグナルがそれぞれ独立した経路で細胞死を誘導しているとすれば、ERK と p38 の双方を阻害するカベルゴリンは U0126 および SB203580 それぞれと相加的な効果を示すはずである。しかし、カベルゴリンと U0126 の共投与は相加作用を示さなかった。ところが、カベルゴリンと SB203580 の共投与は相加的であった (Fig. 2-5C、D)。このことは、p38 シグナルによる細胞死誘導の経路が ERK シグナルと重複または相互作用している可能性を示し、またカベルゴリンが ERK シグナルの阻害により保護作用を示すことを示唆している。

2-5-5. 酸化ストレスと興奮毒性

大脳皮質ニューロンは主にグルタミン酸作動性ニューロンにより構成されている (Kaneko and Fujiyama., 2002)。グルタミン酸作動性ニューロンに酸化ストレ

スがかかると、グルタミン酸の細胞外蓄積が起こり、ニューロンの過剰興奮が起こる (Mailly et al., 1999; Lee et al., 2004)。このようなニューロンの過剰興奮は、細胞外 Ca^{2+} の過剰流入につながり、ミトコンドリアの機能不全や内在性抗酸化物質の減少による活性酸素種の産生を引き起こす (Stanciu et al., 2000; Schinder et al., 1996)。このように酸化ストレスと過剰興奮毒性は密接な関係にあり、実際、酸化ストレスが病態に関与しているとされる脳疾患 (AD、HD、ALS、脳虚血 etc.) では過剰興奮毒性の関与も知られている (Feng and Wang., 2012; Johri and Beal 2012; Barber and Shaw., 2010; Pradeep and Diya., 2012)。また、 H_2O_2 による ERK シグナルの活性化には、細胞外 Ca^{2+} の存在が必要であることが示されており、 H_2O_2 による過剰興奮が MAPK カスケードの活性化に寄与していることが示唆される (Samanta et al., 1998)。過剰興奮に伴う細胞外 Ca^{2+} 流入は、NMDA 型グルタミン酸受容体および電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介して起こるため、それぞれの阻害剤が H_2O_2 による細胞死を抑制することを確かめた (Fig. 2-6B、C)。

2-5-6. カベルゴリンとグルタミン酸トランスポーター

カベルゴリンは H_2O_2 曝露による細胞外グルタミン酸の蓄積を抑制した (Fig. 2-8A)。また細胞外グルタミン酸の再取り込みを担うグルタミン酸トランスポーター (EAAC1、GLT-1) の発現がカベルゴリンにより上昇することを見出した (Fig. 2-8B)。EAAC1 はニューロンに、GLT-1 はアストロサイトに高い発現がみられるグルタミン酸トランスポーターである (Guillet et al., 2002; Himi et al., 2003)。本研究では、両遺伝子の十分なノックダウンを行うことができなかったため、EAAC1/GLT-1 の発現上昇と細胞外グルタミン酸濃度低下の直接的な因果関係を検証することはできなかったが、先行研究において EAAC1/GLT-1 と過剰興奮毒性の関係がそれぞれ報告されている。アンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内投与による EAAC1 のノックダウンは、ニューロンの過剰興奮によるてんかん発作を起こすことが報告されている (Rothstein et al., 1996)。同様に GLT-1 のノックダウンは、過剰興奮毒性による神経細胞死と運動障害を引き起こす (Rothstein et al., 1996)。このようにグルタミン酸トランスポーターの発現量と、細胞外グルタミン酸濃度は密接に関連しており、本研究で見出されたグルタミン酸トランスポーターの発現上昇が、細胞外グルタミン酸蓄積の抑制に寄与している可能性がある。今回の実験系では、シタラビンの投与によりアストロサイトの影響を除外しているため、大脳皮質ニューロンに発現している EAAC1 と GLT-1 の発現が上昇していると考えられる。実際の脳では、アストロサイトに発現している GLT-1 もグルタミン酸の再取り込みに大きく寄与している (Rothstein et al., 1996)。アストロサイトも D2 受容体を発現しているため、カベルゴリンがアストロサイトの GLT-1 の発現を上昇させるか、さらなる検証が必要と思われる (Khan et al., 2001)。

本研究により初めて、D2 受容体の刺激が、グルタミン酸トランスポーターの発現を制御する可能性が示された。先行研究では、EAAC1 と GLT-1 の発現が、てんかん発作や低酸素低グルコース負荷（OGD）後に上昇することが報告されている（Crino et al., 2002; Romera et al., 2004; Ji et al., 2013）。OGD による GLT-1 の発現上昇は、mTOR/Akt/NF κ B 経路の活性化に依存する（Ji et al., 2013）。また、EAAC1 の発現上昇は、OGD 後の TNF- α 発現の上昇に依存することが報告されている（Romera et al., 2004）。TNF- α の代表的な下流シグナル分子に NF κ B があることから、この転写因子が EAAC1 と GLT-1 の発現を制御する共通因子である可能性がある。また、D2 受容体の活性化は、Ca²⁺/calmodulin/calcineurin/NF κ B 経路を活性化することから、NF κ B がカベルゴリンによるグルタミン酸トランスポーターの発現上昇に関与している可能性が考えられる（Takeuchi et al., 2004）。今後、カベルゴリンによるグルタミン酸トランスポーターの発現制御の分子メカニズムをさらに解析することで、グルタミン酸トランスポーターをターゲットとした薬剤の開発に寄与できるかもしれない。

2-5-7. 酸化ストレスの下流経路をターゲットとした AD 治療の可能性

最後に、本実験系において、酸化ストレスに対し神経保護作用を示した薬剤の臨床応用の可能性について、特に大脳皮質における神経変性が顕著な AD に着目し考察する。

2-5-7-1. ERK シグナル

本研究の酸化ストレス曝露モデルと同様に、AD の細胞モデル、動物モデル、患者脳においても、ERK シグナルの活性化が報告されている（Perry et al., 1999; Gan et al., 2014; Feld et al., 2014）。ERK シグナル阻害剤の投与は、AD の細胞モデルにおけるミトコンドリア障害を改善し、また、AD モデル動物の記憶障害を改善することから、AD の治療効果が期待できる（Gan et al., 2014; Feld et al., 2014）。現在認可されている ERK シグナル阻害剤の臨床薬としては、メラノーマの治療薬であるトラメチニブがある（Samatar et al., 2014）。しかし、トラメチニブは、脳-血液関門（BBB）の透過性が不良なため、神経性疾患に臨床応用するには、BBB 透過性が良好な新たな薬剤の開発が必要である。また、ERK シグナルは生理的条件下で記憶・学習などに関与するシグナル経路であるため、臨床に用いる際は、中枢神経系での副作用に十分留意する必要があると思われる（Peng et al., 2010）。

2-5-7-2. p38 シグナル

p38 シグナルも、AD モデル動物において活性亢進が報告されており、その阻害剤の投与が、AD モデル動物のシナプス障害と記憶障害を改善することが報告

されている (Munoz et al., 2007)。p38 シグナルは、自己免疫疾患の治療ターゲットとして、阻害剤の開発・治験が行われてきたが、肝毒性など重篤な副作用が出現したため、これまでのところ、臨床薬として認可されたものは存在しない

(Yasuda et al., 2011)。現在、侵害受容性疼痛や神経障害性疼痛の治療薬候補として、新たに SB681323 と SCIO-469 の治験が行われており、神経性疾患への臨床応用が期待されている (Yasuda et al., 2011)。

2-5-7-3. NMDA 型グルタミン酸受容体

NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) 阻害剤であるメマンチンは、AD の治療薬として認可されている (Anand et al., 2017)。AD の細胞および動物モデルにおいて、メマンチンの投与による過興奮毒性の抑制作用と学習障害の改善効果が報告されている。AD 患者に投与した場合も重篤な副作用はなく、AD 患者の認知機能低下を抑制する効果が認められている。ただし、AD 病態の進行抑制を裏付ける成績は得られていない。

2-5-7-4. 電位依存性 Ca^{2+} チャンネル

電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (VDCC) 阻害剤は、高血圧症の治療薬として、様々な種類の薬剤が認可されている。現在、VDCC 阻害剤であるイスラジピンについて、PD に対する有効性を調べる治験が行われている (Biglan et al., 2017)。これは、高血圧治療のために VDCC 阻害剤を服薬している人の PD 発症リスクが低いという疫学調査や、VDCC 阻害剤が PD モデル動物の神経変性を抑制する効果が認められたことを根拠にしている (Surmeier et al., 2017)。AD についても VDCC 阻害剤による発症リスクの減少が報告されており、AD への適応拡大が期待される (Anekonda and Quinn., 2011)。

2-5-7-5. ドーパミン D2 受容体

本研究により、大脳皮質神経細胞に対する D2 受容体作動薬の保護作用が明らかとなった。序論で述べたように、D2 受容体作動薬は、PD など様々な神経性疾患の治療薬として用いられている。薬剤の忍容性適応拡大のための治験の実施は比較的容易であると考えられる。臨床への応用を目指す上で、今後、AD モデル動物など *in vivo* の系においても、D2 受容体作動薬が保護作用を発揮するか検証する必要があるだろう。

Table 2-1. シグナル阻害剤/Ca²⁺阻害剤の臨床薬/治験薬

ターゲット	FDA*認可薬/ 治験薬	適応症	参考文献
D2 受容体 作動薬	カベルゴリン 他	PD 他	Curran and Perry., 2004
ERK シグナル 阻害剤	トラメチニブ	メラノーマ	Samatar et al., 2014
p38 シグナル 阻害剤	SB681323 SCIO-469	侵害受容性疼痛 (第 II 相試験) 神経障害性疼痛 (第 II 相試験)	Yasuda et al., 2011
NMDA 型 Glu 受容体阻害剤	メマンチン	AD	Anand et al., 2017
電位依存性 Ca ²⁺ チャネル 阻害剤	イスラジピン 他	高血圧症 PD (第 III 相試験)	Surmeier et al., 2017

*アメリカ食品医薬品局

Figure 2-9

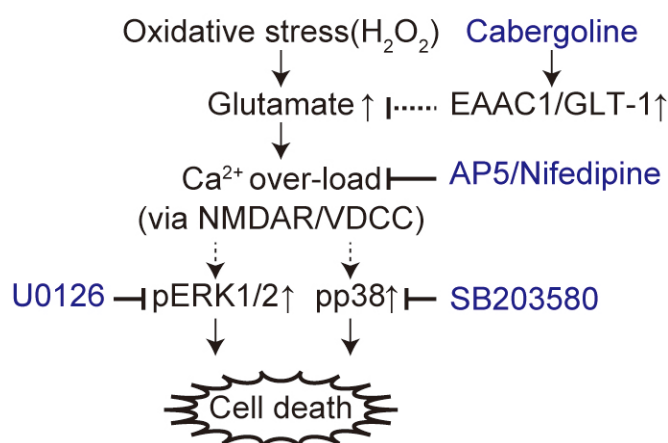


Figure 2-9. カベルゴリンによる神経保護メカニズムの仮説

点線：先行研究から示唆される経路 青：薬剤

酸化ストレス曝露は細胞外グルタミン酸の蓄積とそれに伴う細胞内 Ca²⁺の過剰流入

(Ca²⁺ over-load) を引き起こす。Ca²⁺ over-load は MAPK カスケード (ERK および p38 シグナル経路) を活性化し、アポトーシスを誘導する。カベルゴリンはグルタミン酸トランスポーターの発現を上昇させることで、細胞外グルタミン酸の再取り込みを増強する。その結果、細胞外グルタミン酸の蓄積が抑制され、アポトーシスが阻害される。

第3章：グルココルチコイド曝露による神経障害の解析

3-1. 概要

妊娠期の母体に対する精神的・身体的なストレスが、生まれた子の将来的な発達障害や精神疾患の発症リスクを上昇させることが報告されている。この作用に、ストレス負荷により母体血中で増加するホルモンであるグルココルチコイド (GC) の関与が示唆されている。また、動物モデルを用いた実験から、グルココルチコイドが胎児神経幹/前駆細胞 (eNSPC) の神経新生を障害することが報告されているが、その分子的機序は、まだ明らかでない。本研究では、ラットの胎児から分取した eNSPC を用いて、GC が神経新生に与える影響とその分子的機序の解明を目的とした。GC の曝露は、eNSPC の分化に伴う、神経細胞またはアストログリア特異的なマーカータンパク質の発現上昇を抑制した。また、分化過程における細胞の生存率を減少させた。さらに、GC は、分化に伴った ERK シグナル伝達経路および PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化を阻害した。両シグナルの阻害剤が、NSPCs の分化および生存を抑制したことから、これらのシグナルの活性化が NSPCs の分化に寄与していることが明らかとなった。さらに、両シグナル経路の活性化因子である Insulin-like growth factor I の投与が、GC による分化抑制作用を回復させることを示した。以上の結果は、GC による ERK および PI3K/Akt シグナル経路の抑制が、NSPCs の分化抑制を引き起こす可能性を示唆している。

3-2. 序論

3-2-1. 外的ストレスとグルココルチコイド

現代における公衆衛生の改善と医療体制の発達、感染症や栄養失調を原因とする疾患を劇的に減少させ、身体的な健康を飛躍的に向上させた（厚生労働省 人口動態調査）。一方で、ストレス社会と形容されるように、本邦におけるうつ病や不安障害といったストレスに一因があると考えられている気分障害の有病率は、年々増加傾向にある。これからの社会では、精神面での健康を向上させるため、ストレス性の精神疾患に対する対応が求められている（厚生労働省 患者調査）。

医学・生物学的な側面から、ストレスという概念を初めて体系的に提唱したのは、Hans Selye である。彼は、外傷、騒音、寒冷、化学物質の投与、恐怖、痛み、および拘束といった生体恒常性を脅かす（または脅かすと予期させる）様々な刺激が、副腎皮質の肥大化や胸腺・脾臓の収縮、胃・十二指腸のびらんといった同一の生体反応を誘発することを発見した（Selye., 1936; 1956; 1976）。そして、彼は、“外部刺激に対する非特異的な生体応答”をストレス、その“ストレスを引き起こす外部刺激”をストレッサーと定義した（Szabo et al., 2012）。現在では、原義のストレッサーをストレスと呼称することが多い（拘束ストレスや外敵ストレスなど）ため、以降の表記では、現在の呼称に従う。その後、このストレス応答を仲介する物質として、副腎皮質から血中に分泌されるホルモン物質が同定された。この物質は、グルココルチコイド（GC）と名付けられ、現在では、ストレスホルモンの別称でもよく知られている。血中 GC 濃度の上昇は、血糖値の上昇や血圧・心拍出量の増加、免疫応答の抑制を誘導し、身体機能の活性化や感染による炎症の抑制などストレスに抵抗するのに必要な作用を発揮する

（Sapolsky et al., 2000）。ストレスによる GC の分泌は、視床下部-下垂体-副腎皮質軸（HPA 軸）と呼ばれる内分泌機構により、制御されている（Smith and Vale., 2006）。ストレス刺激は、脳にある視床下部の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRF）の分泌を促し、CRF はやはり脳の下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）の分泌を誘導する。さらに血中で増加した ACTH は、腎臓の上にある副腎皮質からの GC 分泌を引き起こす。ここで重要となるのは、血中で上昇した GC が、脳の前頭前皮質や海馬、視床下部、下垂体に作用することで、CRF と ACTH の分泌を抑制することである。こうしたネガティブフィードバック機構により、ストレス負荷時の血中 GC 濃度が不必要に高くなるのを防ぎ、また、ストレス刺激が除かれた後、GC の血中濃度が速やかに平常時と同じレベルまで低下することが可能となっている。

上述の通り、血中 GC 濃度の一過的な上昇によるストレス反応は、個体の生存に対し、有利に働くと考えられている。一方で、ストレスの慢性化は、血中 GC

濃度の上昇を常態化させ、体内の恒常性破綻を引き起こす可能性が、Selye のストレス理論で提唱されている (Szabo et al., 2012)。この仮説は、病的肥満や糖尿病、自己免疫疾患など様々な疾患の病因の 1 つとして支持されており、そうした疾患の中でも特に、精神疾患との関連は注目され、よく研究されている (Streeten., 1993; Roy et al., 1993; Tsigos et al., 1993; Sternberg., 2001; Numakawa et al., 2013)。日常的なストレスが発症のきっかけと考えられている大うつ病は、長期間の抑うつ状態と自殺願望などを症状とする精神疾患である。大うつ病患者の約 30%において、血中 cortisol (ヒト内在性 GC) の高値が認められる (Young et al., 2001)。多くの場合、この血中 GC の上昇は、HPA 軸のネガティブフィードバック機構の破綻 (HPA 軸の脱抑制) を伴っており、これが GC 濃度の病的上昇の原因と考えられている (Dedovic and Ngiam., 2015)。動物モデルにおいても、慢性的なストレス負荷が、HPA 軸の脱抑制を引き起こすことが報告されており、その機序として、海馬や前頭前皮質における GC の受容体の発現減少の関与が示唆されている (Wright et al., 2006)。GC の受容体には、高親和性受容体であるミネラルコルチコイド受容体 (MR) と低親和性受容体であるグルココルチコイド受容体 (GR) の 2 つが存在する (De kloet et al., 1998)。いずれも、GC との結合により活性化され、主として転写因子として作用する。MR は、通常の血中 GC 濃度においても GC と結合し活性化されているのに対し、GR は、ストレスにより GC 濃度が上昇した場合に活性化されることから、生体におけるストレス応答反応は、主として GR の作用であると考えられている (De kloet et al., 1998)。慢性ストレスによる持続的な GC の上昇と GR の活性化は、GR の発現量の減少を引き起こし、海馬や前頭前皮質領域の神経細胞を介した HPA 軸のネガティブフィードバック機構が損なわれる。その結果、GC の過剰な分泌を促進してしまうと考えられている。過剰な GC は、神経細胞のシナプス障害や海馬の神経新生の阻害、など様々な悪影響を脳に与えることが報告されており、これらがうつ病の病態発現に関与している可能性がある (Saito et al., 2016; Sawamoto et al., 2016)。

3-2-2. 母体ストレスと出生児における発達障害 (疫学研究)

ストレスが原因のひとつとされる精神疾患においても、ストレスがきっかけで発症するケースと、同じストレスを受けた場合でも発症しないケースがある。すなわち、すべての人が発症する訳ではなく、発症には、その人が有する素地 (ストレスに対する脆弱性) が関与すると思われる。この素地の形成には、遺伝的素因と共に、胎児期から思春期までの神経発達期における環境的要因が影響を与える可能性が高い。この点において、精神疾患と神経発達障害は類似しており、事実、両者間で共通するリスク因子は多い。特に、胎児期における胎内環境の影響は大きく、妊娠中の母体のウイルス感染やアルコール摂取と共に、外的ストレスが共通するリスク因子として挙げられる (Li et al., 2012)。疫学的研究から、妊娠

中の母体に対する精神的・身体的ストレスが、生まれた子の将来的な発達障害（注意欠陥・多動性障害、自閉症スペクトラム障害）や精神疾患（統合失調症、うつ病）の発症リスクを上昇させることが報告されている（van Os and Selten, 1998; van den Bergh and Marcoen., 2004; Beversdorf et al., 2005; Grizenko et al., 2012; Graignic-Philippe et al., 2014）。また、母体ストレスは、子の出生体重、認知機能、および脳の灰白質容量と負の相関を示す（Wadhwa et al., 1993; Entringer et al., 2009; Buss et al., 2010）。母体ストレスが、子の神経発達に与える影響の詳細な分子メカニズムには不明な点が多いが、やはり母体血中の GC 濃度上昇が疑われている（Wadhwa et al., 1993; Wilcoxon and Redei., 2007; Salmon et al., 2011）。母体の血中または羊水中の cortisol 濃度は、出生体重や認知機能と負の相関を示すことが報告されている（Goedhart et al., 2010; Bolten et al., 2011; Bergman et al., 2010）。通常、母体由来の GC は、胎盤中に豊富に存在する 11- β hydroxysteroid dehydrogenase type2 (11 β -HSD2) により、不活性な cortisone に代謝されるため、GC の胎児血中への流入は減少する（Reynolds., 2013）。しかし、母体ストレスは、この 11 β -HSD2 の発現量および酵素活性を減少させることが、動物実験において報告されている（Mairesse et al., 2007）。また、ヒトにおいても、母体の感じている不安の大きさと胎盤の 11 β -HSD2 の発現量・酵素活性が負の相関を示すことが報告されている（O'Donnell et al., 2012）。このことから、母体がストレス下にある場合、血中 GC 濃度の上昇と 11 β -HSD2 の活性低下により、GC が胎児血中に高濃度で流入する可能性がある（Reynolds., 2013）。

胎児に対する GC の高濃度曝露が生じる状況として、母体ストレス以外にも、治療目的で母体に合成 GC を投与するケースが挙げられる。GC は胎児の肺成熟を促進する効果があるため、早産の恐れがある場合に、合成 GC を投与することがある（Braun et al., 2013）。合成 GC は 11 β -HSD2 による分解を受けないため、母体に投与された合成 GC はそのまま、胎児血中へ流入する。合成 GC の投与は、新生児の呼吸窮迫症候群のリスクを減少させる一方で、出生体重・頭周囲の減少、子供の認知機能の低下、および多動・注意散漫など情動発達への影響が、多く報告されている（French et al., 1999; Crowther et al., 2007; French et al., 2009; Braun et al., 2013）。ただし、合成 GC の発達への影響を否定する報告も存在するため、今後、より大規模な疫学的研究による検証が必要である（Stutchfield et al., 2013）。

3-2-3. 母体ストレスと行動学的異常（動物モデル）

母体ストレスは、ヒト以外の動物においても、仔の行動学的異常を引き起こすことが知られており、特にラットを用いた研究は盛んに行われている。母ラットを妊娠 19 日目に外敵ストレス（猫と同じ箱に 15min 入れる）に曝した場合、その仔は、出生時の死亡率上昇と出生体重の低下を示し、成獣となった後も長期記憶の低下と不安様行動を示すことが報告されている（Lordi et al., 2000）。また、妊娠

13-21 日目のラットに対する複合的なストレス刺激（拘束、強制水泳および高所ストレスの組み合わせ）が、仔の不安様行動と物質認識記憶能力の低下（メスのみ）、空間記憶障害（オスのみ）を引き起こすことが報告されている（Salomon et al., 2011）。興味深いことに、母体ストレスによる仔の不安様行動は、ストレス負荷前に母体の副腎皮質を除去することで消失する。さらに、副腎皮質除去を行った母体に、ストレス負荷時の血中濃度と同程度の Corticosterone (CORT、ラットの内在性 GC) を投与すると、仔の不安様行動が誘発される。一方で、物質認識記憶（メス）および空間記憶（オス）の障害は、副腎皮質除去による影響を受けていない。このことから、少なくとも母体ストレスによる不安様行動は、母体の GC 増加が原因となっている可能性がある（Salomon et al., 2011）。ただし、他のグループが行った母体ストレス研究では、オス特異的に観察された空間記憶能力の低下も、母体の副腎皮質除去により改善したという報告もあり、記憶障害に関しては、まだ一致した見解が得られていない（Zagron and Weinstock., 2006）。

うつ様行動に関しても、母体ストレスの影響が報告されている。妊娠 15 日目から出産まで、毎日一定時間の拘束ストレスに曝されたラットの仔は、メスのみ、成獣後のうつ様行動が認められた（Alonso et al., 1991）。また、母体の副腎皮質除去後に高濃度の CORT 投与を行った場合も同じく、メスの仔にのみ、うつ様行動が見られた（Wilcoxon and Redei, 2007）。こうした母体ストレスを受けた仔は、成獣後においても、ストレス負荷時に GC 分泌が過剰に起きることが報告されている（Barbazanges et al., 1996）。これと同時に、海馬の GR や MR の発現減少が認められることから、母体ストレスを受けた仔には、HPA 軸の脱抑制が起きていると考えられる（Barbazanges et al., 1996; Bingham et al., 2013）。この GC 分泌の亢進は、母体の副腎皮質除去により消失することから、胎生期における GC の曝露が、仔の HPA 軸の発達形成に悪影響を与えらると思われる（Barbazanges et al., 1996）。前述の通り、HPA 軸の脱抑制は、大うつ病に密接に係わる表現型であるため、これらの研究は、胎児期の GC 曝露が将来的なうつ病発症の素地をつくるという仮説を強く支持している。

その他にも、心的外傷後ストレス障害に関連した行動異常が、母体ストレスを受けた仔において報告されている。妊娠 14-21 日に拘束ストレスを受けた母ラットの仔は、一度条件付けを行った恐怖記憶の消去学習に障害が生じる（Bingham et al., 2013）。母体ストレスの代わりに、母体に CORT を投与した場合も同様の障害がみられることから、この障害にもやはり GC が関与することが示唆される。また、母体ストレスと CORT 投与のいずれにおいても、脳の青斑核に存在するノルアドレナリン作動性神経細胞において、チロシン水酸化酵素（ノルアドレナリン合成の律速酵素）の発現減少がみられた（Bingham et al., 2013）。青斑核から前頭前皮質へのノルアドレナリン刺激は、恐怖記憶の消去学習に関与することから、これらの経路の異常が、消去学習の抑制に関与している可能性がある（Mueller et

al., 2008)。

以上の様に、母体ストレスは、記憶障害や不安様行動、うつ様行動、恐怖記憶の消去学習障害といった様々な行動学的異常を誘発し、その多くは母体からの GC に曝されることに起因していると考えられる。こうした異常の一因として、胎児期から新生児期における GC 曝露が、神経発達期の神経新生を障害する可能性が示唆されている。生後 4-7 日目のラットに対する Dexamethasone (DEX、合成 GC) の投与は、体重減少、海馬の容積減少、および脳室下帯・大脳皮質・海馬歯状回（神経新生の起きる脳部位）領域での増殖性細胞の減少を引き起こす (Kanagawa et al., 2006)。また、妊娠 15.5 日目のマウスに対する DEX の単回投与においても、仔の体重減少、海馬容積の減少、そして海馬歯状回における増殖細胞の減少が報告されている (Noorlander et al., 2014)。驚くべきことに、海馬歯状回の増殖細胞の減少は、成獣後においても観察された (Noorlander et al., 2008)。また、成獣後において、寿命の短縮のみならず、海馬神経細胞のシナプス可塑性のひとつである長期抑圧の障害や空間記憶の障害が認められた。これも、胎生期の DEX 投与が生涯にわたって、悪影響を与える例である (Noorlander et al., 2008)。

3-2-4. GCs による神経新生障害（細胞モデル）

胎児期における神経新生とは、胎生神経幹/前駆細胞 (eNSPCs) の増殖と神経細胞・グリア細胞への分化が盛んに行われる、脳形成における重要なステップである。そのため、神経新生における障害は、その後の神経発達障害や精神疾患の発症リスクを高める素地の形成に関与する可能性がある (Fan et al., 2017; Noriko and Nannan., 2011)。上述の通り、動物実験において、GCs の胎生期曝露が神経新生を障害する可能性が示されている。また、細胞モデルにおいても、GCs が NSPCs に与える影響について詳細な解析が行われている。

ヒト海馬由来の株化 NSPCs を用いた研究では、cortisol の投与が、その濃度により異なる影響を NSPCs の増殖と分化に対して与えることが報告されている (Anacker et al., 2013)。低濃度の cortisol (100 nM) は、細胞増殖とアストロサイトへの分化を促進したが、神経細胞への分化を抑制した。ところが、高濃度の cortisol (100 μ M) は、神経細胞への分化のみならず、細胞増殖をも抑制した。興味深いことに、低濃度の cortisol の作用は MR 阻害剤によって、一方で高濃度の作用は GR 阻害剤によって喪失し、MR と GR が NSPCs に対し、異なる役割を果たしていることが示唆されている (Anacker et al., 2013)。また、cortisol の投与は、細胞内の Hedgehog シグナル経路を抑制しており、同シグナルの活性化剤が cortisol による神経分化抑制を減弱させることも報告されている (Anacker et al., 2013)。これらのシグナル異常は、母体ストレスを受けたラットの海馬でも認められることから、神経新生障害の分子機序として注目されている (Anacker et al., 2013)。

他のグループにおいても、GC によるシグナル伝達異常に着目した研究が行わ

れている。ヒト胎児の脳皮質から採取した eNSPCs は、DEX の投与により、その増殖と神経分化が抑制された (Moors et al., 2012)。同時に、DEX の投与は、eNSPCs の Dickkopf1 (DKK1, 内在性 Wnt シグナルアンタゴニスト) の発現を上昇させ、Wnt シグナルの下流ターゲットである cyclin D1 と inhibitor of DNA binding2 の発現を減少させた。DKK1 に対する中和抗体の投与が、DEX による増殖と神経分化抑制を改善したことから、Wnt シグナルの関与も重要であると考えられる。

我々のグループでは既に、ラット脳皮質ニューロンに対する GC 曝露が、脳由来神経栄養因子 (BDNF) にて励起される ERK シグナルの活性化とそれに伴うシナプス成熟を阻害することを報告した (Kumamaru et al., 2011)。BDNF を含む神経栄養因子群および増殖因子群により活性化する ERK や PI3K/Akt シグナル経路は、NSPCs の増殖と分化の双方に影響することはよく知られている (Ishii et al., 2010; Liu et al., 2014; Nguyen et al., 2009; Qiao et al., 2012)。ところが NSPCs において、これら ERK および PI3K/Akt シグナル経路への GC 曝露の影響はほとんど不明であり、Hedgehog や Wnt などのシグナル伝達経路に対する解析に比べ遅れている。そこで、本研究では、GC が神経新生を障害する分子メカニズムについて解析をするに当たり、特に ERK と Akt シグナル伝達の関与の可能性を検証した。

3-3. 実験方法

3-3-1. eNSPCs の初代培養

本研究は、動物実験倫理委員会（国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）の承認のもと、動物実験倫理委員会の指針に従って行った。実験に使用した eNSPCs は、胎生 14 日目の Wistar ラットの終脳から分取した。母体ラットにイソフルランを吸入させた後に、開腹し、子宮から胎児を素早く取り出した。胎児の終脳を、実体顕微鏡下で、単離し、メスで裁断した後に、10 ml のパパイン溶液（9 units/ml のパパインと 200 units/ml を含む PBS 溶液）を加え、37°C で 20 分間振盪した。1400 rpm で 1 分間の遠心分離を行い、上清を除去した後、10 ml の DMEM/F12 培地を添加し、ピペッティングを行い、細胞をよく懸濁した。その後、sterilizing filter により組織片を取り除いた。1400 rpm で 5 分間の遠心分離を行い、上清を除去後に、50 ml の増殖培地（1/500 量の KBM Neural stem cell Supplement を含む KBM Neural stem cell medium（KOHJIN BIO, saitama, Japan））を加えよく懸濁した。血球計算盤で細胞密度を計測し、 $0.5\text{--}1.5 \times 10^6$ cells/ml になるよう希釈し、T75 フラスコ（BD Falcon）で 5% CO₂、37°C の条件下で 4 日間、浮遊培養を行った。増殖性の eNSPCs は、Neurosphere と呼ばれる球状の細胞塊を形成する。4 日後に、形成された Neurospheres を回収し、1400 rpm で 1 分間遠心分離し、上清を除く。0.05% トリプシン/EDTA 溶液（Sigma-Aldrich）を添加し、37°C で 5 分間処理した後に、ピペッティングを行った。1400 rpm で 1 分間の遠心分離を行い、上清除去後に、増殖培地に懸濁した。血球計算盤で細胞密度を測定し、 5×10^4 cells/cm² になるよう、ポリエチルイミンでコーティングした 3.5 cm dish か 48 well plate またはガラスボトム dish に播種し、5% CO₂、37°C の条件下で培養を行った。増殖試験では、その後、薬剤投与下で 3-7 日間培養した。分化試験では、増殖培地で 3 日間培養した後、分化培地（1/50 量の B27 supplement を含む KBM Neural stem cell medium）への培地交換を行い、その後さらに 3-7 日間培養を行った。

3-3-2. 薬剤処理

GC 曝露実験には、ラットの内在性 GC である CORT（Sigma-Aldrich）と合成 GC である DEX（Sigma-Aldrich）を用いた。これらの GC は、eNSPCs をプレートまたは dish 上に播種してから 3-5 時間後に添加し、その後、解析を行うまで、曝露を行った。投与濃度は、ストレス負荷時のラットの血中 CORT 濃度を参考に、Fig.1 の一部の実験を除き、0.1-10 μ M の範囲で行った（Bingham et al., 2013）。また、U0126（10 μ M, Millipore）と LY294002（10 μ M, Cell signaling）は分化誘導後 1 日目から投与を行った。Rat recombinant insulin-like growth factor（IGF-I, 100 ng/ml, R&D Systems Inc.）も同様に、分化誘導後 1 日目から投与を行った。

3-3-3. MTT assay

増殖試験後の生存細胞数の定量と、分化試験後の細胞生存率の測定のため、48 well plate を用いて、MTT assay を行った。手法については、第 2 章の“2-3-3. MTT assay”を参照。

3-3-4. 免疫染色

増殖試験後の eNSPCs の細胞数の定量のために、eNSPCs のマーカー分子である Nestin・SOX2 の免疫染色を行った。免疫染色の手法については、第 2 章の“2-3-5. 免疫染色”を参照。使用した一次抗体・二次抗体は以下の通り：Nestin 抗体 (Millipore, 1000 倍希釈)、SOX2 (Abcam, 1000 倍希釈)、Alexa Fluor 488 mouse IgG_{2A} 抗体 (Life Technologies, 200 倍希釈)、Alexa Fluor 546 rabbit IgG 抗体 (Life Technologies, 2000 倍希釈)。

3-3-5. タンパク質抽出とウェスタンブロッティング

マーカータンパク質とリン酸化シグナルの検出のために、ウェスタンブロッティングを行った。タンパク質抽出およびウェスタンブロッティングの手法は、第 2 章の「2-3-6. タンパク質抽出とウェスタンブロッティング」を参照。使用した一次抗体と二次抗体は以下の通り。SOX2 抗体 (Abcam)、TUJ1 抗体 (Berkeley Antibody Company, CA, USA)、Doublecortin 抗体 (DCX, Cell signaling)、Syntaxin 抗体 (Signa-Aldrich)、Synapsin I 抗体 (Millipore)、GluR1 抗体 (Millipore)、GAD65/67 抗体 (Signa-Aldrich)、GFAP 抗体 (Millipore)、 β -Actin 抗体 (Signa-Aldrich)、phospho-ERK (Thr202/Thr204) 抗体 (Cell signaling)、ERK 抗体 (Cell signaling)、phospho-Akt (S473) 抗体 (Cell signaling)、Akt 抗体 (Cell signaling)、Rabbit IgG (H&L) Secondary Antibody Peroxidase Conjugated Properties (Rockland Immunochemicals Inc.)、Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Labs Inc.)。

3-3-6. 統計処理

統計処理の方法は、第 2 章の「2-3-10. 統計処理」を参照。

3-4. 実験結果

3-4-1. GC の曝露は、eNSPCs の増殖には影響を与えない

GC が eNSPCs の増殖能に与える影響を調べるため、増殖条件下の eNSPCs に対し、3 日間の CORT 曝露を行った。0 日目と 3 日目のいずれにおいても、多くの細胞が NSPCs のマーカータンパク質である Nestin と SOX2 を発現しており、eNSPCs の増殖が確認された (Fig. 3-1A)。CORT の増殖への影響を調べるため、3 日目における Nestin 陽性細胞の数を定量したが、CORT 投与による細胞数の有意な変動は見られなかった (Fig. 3-1A)。同様に、MTT アッセイによる生存細胞数の測定においても、CORT 投与の有無による差異は認められず、また、7 日間の CORT 投与を行っても影響は見られなかった (Fig. 3-1B、C)。DEX についても、CORT と同様に 3 日間の投与を行ったが、やはり生存細胞数への影響は確認できなかった (Fig. 3-1D)。以上の結果から、本培養系における GC 曝露は、eNSPCs の増殖に影響を与えないことがわかった。

Figure 3-1

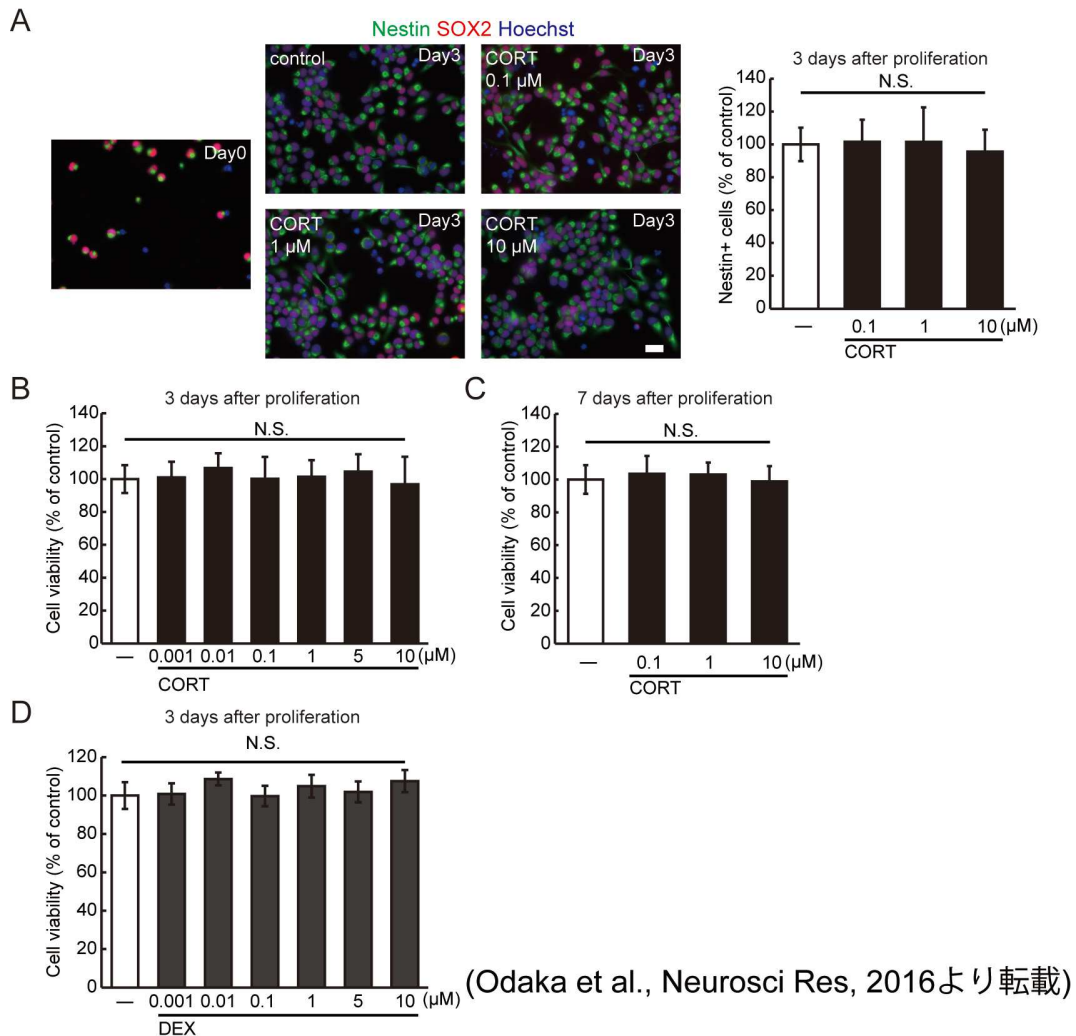


Figure 3-1. GCの曝露がeNSPCsの増殖へ与える影響

増殖条件下のeNSPCsに対し、CORTあるいはDEXを0.001-10 μ M、または0.1-10 μ Mの濃度にて投与した。(A) CORT投与後0日目と3日目において、NestinおよびSOX2抗体による免疫染色を行った。曝露3日目におけるNestin陽性細胞を計測して定量を行った(n=12 from 4 dishes)。赤：SOX2、緑：Nestin、青：Hoechst33342(細胞核の検出)、スケールバー：20 μ m (B) CORT投与後3日目の生存細胞数をMTT assayにより解析した(n=6-12)。(C) CORT投与後7日目の生存細胞数をMTT assayにより解析した(n=6)。(D) DEX投与後3日目の生存細胞数をMTT assayにより解析した(n=6-12)。N.S.: not significant

3-4-2. 神経分化誘導に伴うマーカータンパク質の発現変動

続いて、eNSPCsの有する神経分化能を調べるため、増殖因子(塩基性線維芽細胞成長因子および上皮成長因子)を培地中から除き、それによる自発的な神経分化を誘導した。eNSPCsの分化状態を調べるため、分化誘導に伴うマーカータ

ンパク質の発現変動を WB により定量した (Fig.3-2)。NSPCs のマーカーである SOX2 は、分化に伴い発現が減少したのに対し、神経細胞マーカー (TUJ1、DCX) やシナプスマーカー (synapsin I、syntaxin、GluR1)、GABA 作動性神経細胞マーカー (GAD65/67)、アストロサイトマーカー (GFAP) はそれぞれ発現が上昇した。TUJ1 と DCX、Syntaxin、GFAP は分化誘導後 3 日目から、synapsin I、GAD65/67 では 5 日目、GluR1 では 7 日目において有意な発現上昇が認められた。

Figure 3-2

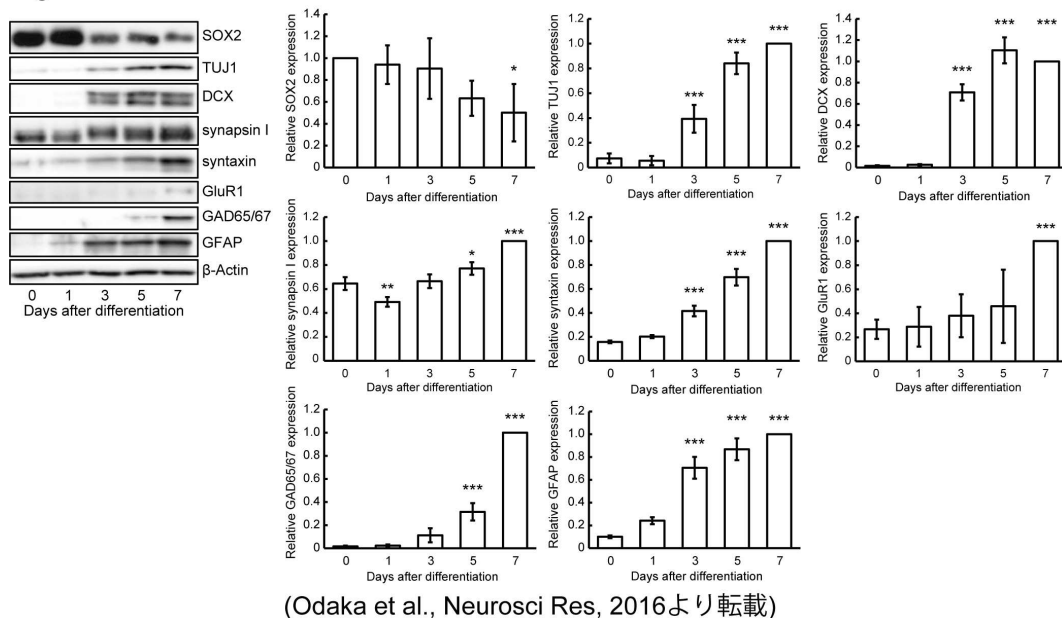


Figure 3-2. eNSPCs の分化に伴うマーカータンパク質の発現変動

神経分化条件下の eNSPCs におけるマーカータンパク質の発現変動を WB により測定した (n=4)。SOX2 : NSPCs マーカー、 TUJ1・DCX : 神経細胞マーカー、Synapsin I・Syntaxin・GluR1 : シナプスマーカー、GAD65/67 : GABA 作動性神経細胞マーカー、GFAP : アストロサイトマーカー、β-Actin : 内部コントロール *** P<0.001、** P<0.01、* P<0.05 vs Day 0.

3-4-3. GC 曝露は eNSPCs の神経分化を抑制し、その細胞生存率を減少させる

GC 曝露が eNSPCs の分化過程に与える影響を調べるため、分化誘導中に CORT 曝露を行い、分化誘導後 3 日目と 7 日目にサンプルを回収し、マーカータンパク質の発現量の解析を行った。分化誘導後 3 日目では、10 μM の CORT 投与群において、神経細胞・シナプスマーカー (TUJ1、DCX、Synapsin I、Syntaxin) の発現減少が認められた (Fig.3-3A)。また、0.1-10 μM の CORT 投与により、アストロサイトマーカーである GFAP の用量依存的な発現減少が認めら

れた (Fig.3-3A)。一方で、NSPCs マーカーである SOX2 の発現には影響が見られなかった (Fig.3-3A)。分化誘導後 7 日目においても、10 μ M の高濃度の CORT 投与による、TUJ1 を除く神経細胞・シナプスマーカー (DCX、Synapsin I、Syntaxin、GluR1、GAD65/67) の発現減少と、1-10 μ M の CORT 投与による GFAP の発現減少が認められた (Fig.3-3B)。続いて、細胞生存率を MTT assay により解析した。誘導後 3 日目では細胞生存率に変化はなかったが、誘導後 7 日目では、10 μ M の CORT 投与による生存率の低下がみられた (Fig.3-3C、D)。以上の結果から、CORT ストレスが神経細胞とアストロサイトへの分化を抑制し、さらに細胞の生存率を低下させる可能性が示された。

続いて、CORT の場合と同様の実験を、DEX についても行った。誘導後 3 日目と 7 日目のいずれにおいても、0.1-10 μ M の DEX 投与群では DCX、Syntaxin、GFAP の発現減少が認められた (Fig.3-4A、B)。また、0.1-10 μ M の DEX 曝露は、誘導後 7 日目における細胞生存率を減少させた (Fig.3-4C、D)。

Figure 3-3

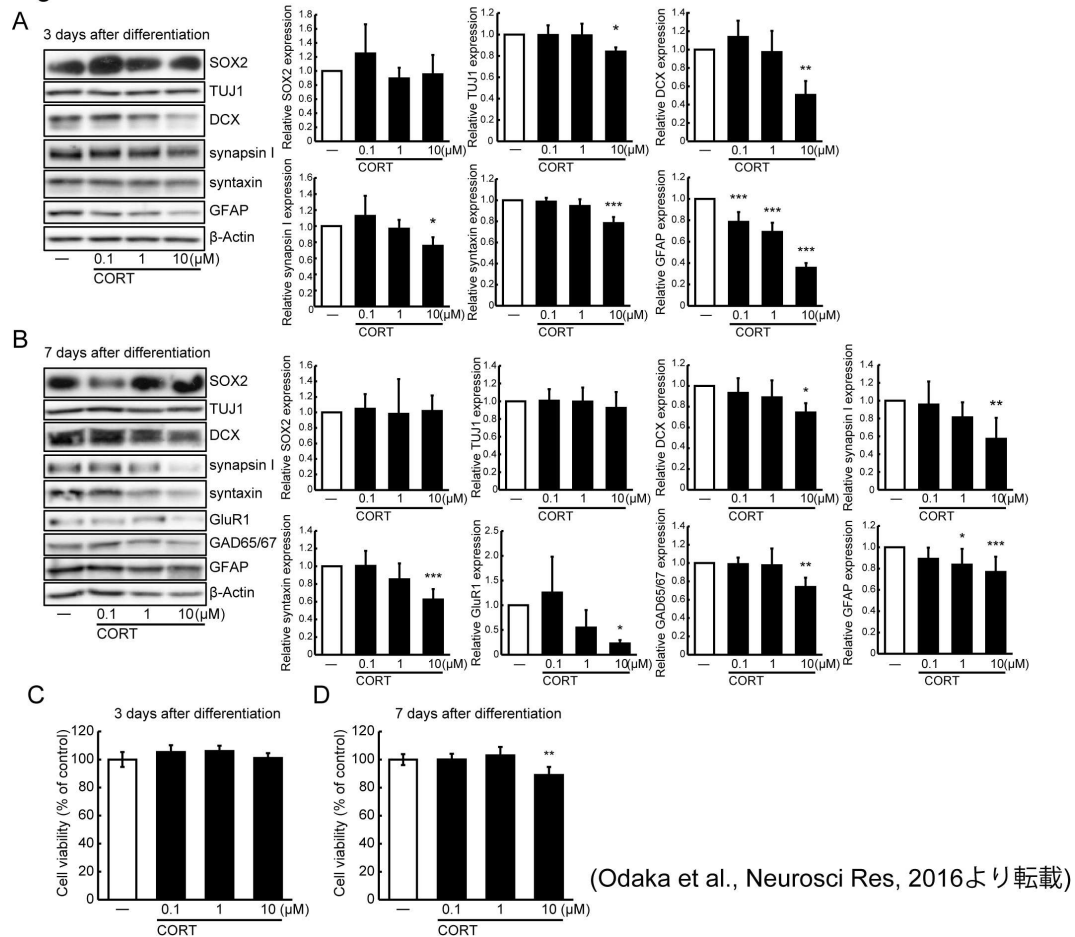


Figure 3-3. CORT 曝露による eNSPCs の分化と生存への影響

神経分化を促す条件下にある eNSPCs に対し、CORT (0.1-10 μ M) を投与した。(A) 誘

導後 3 日目におけるマーカータンパク質を WB で検出し、定量を行った (n=5-9)。(B) 誘導後 7 日目のマーカータンパク質の発現を WB で解析・定量した (n=5-9)。(C) (D) 誘導後 3 日目 (C) と 7 日目 (D) における細胞生存率を MTT assay により測定した (n=6)。*** P<0.001、** P<0.01、* P<0.05 vs CORT 未投与群。

Figure 3-4

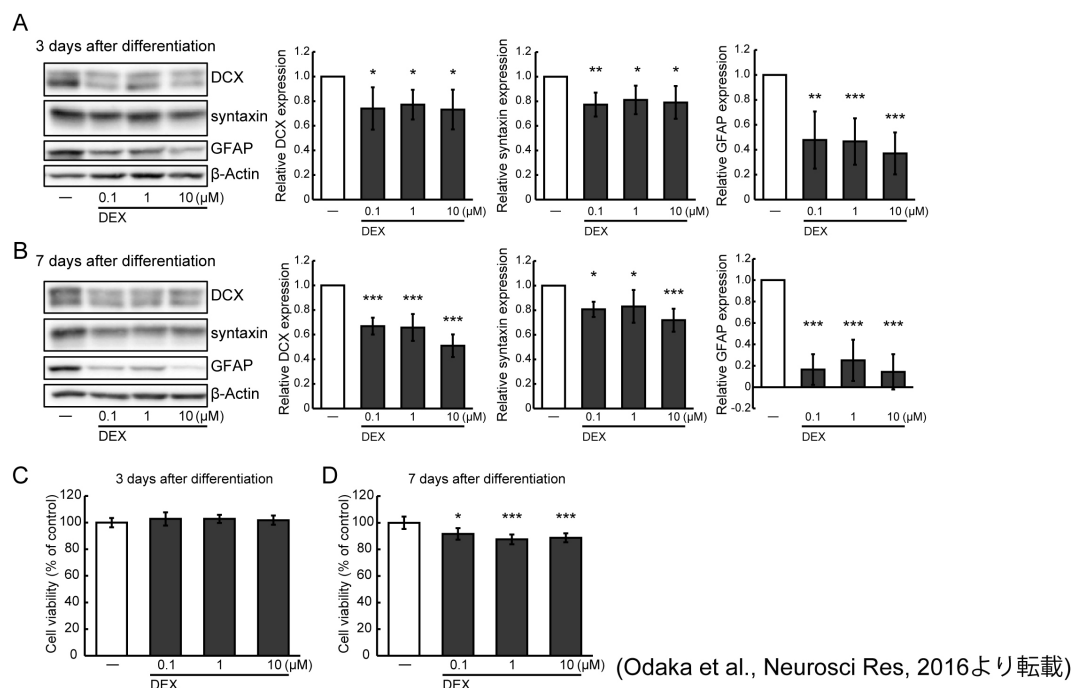


Figure 3-4. DEX 曝露による eNSPCs の分化と生存への影響

分化条件下の eNSPCs に対し、DEX (0.1-10 μM) の投与を行った。(A) 誘導後 3 日目におけるマーカータンパク質の発現 (n=5-6)。(神経細胞; DCX., シナプス; syntaxin., アストロサイト; GFAP) (B) 誘導後 7 日目のマーカータンパク質の発現 (n=5-6)。(C) (D) 誘導後 3 日目 (C) と 7 日目 (D) における細胞生存率 (n=6)。*** P<0.001、** P<0.01、* P<0.05 vs DEX 未投与群。

3-4-4. GC は、eNSPCs の神経分化に伴う ERK1/2 と Akt の活性化を抑制する

ERK シグナルと PI3K/Akt シグナルは、神経栄養因子による神経分化・細胞生存促進作用においても非常に重要な役割を担っている (Ishii et al., 2010; Qiao et al., 2012)。そこで、GC の分化抑制作用の機序を調べる為に、これら ERK シグナルと PI3K/Akt シグナルの変化に着目した。まず最初に、eNSPCs の分化誘導中における両シグナルの内在的な活性状態を調べるため、ERK1/2 と Akt の活性化を反映するリン酸化状態を、WB 法を用いて検出した。リン酸化 ERK1/2 (pERK1/2) は、誘導後 5-7 日目に上昇するのに対し、リン酸化 Akt (pAkt) は誘導後 3-5 日に有意

な上昇を示した (Fig.3-5)。続いて、CORT 投与がこれら pERK1/2 と pAkt に与える影響を解析した。誘導後 3 日目では、10 μ M 投与群における ERK2 のリン酸化抑制と、1-10 μ M 投与群における Akt のリン酸化抑制がそれぞれ認められた (Fig.3-6A)。誘導後 7 日目では、1 μ M CORT 投与群において ERK1/2 のリン酸化が亢進しているのに対し、10 μ M 投与群では、リン酸化は減少した (Fig.3-6B)。一方、pAkt は 10 μ M 投与群でのみ有意な減少が認められた (Fig.3-6B)。以上の結果から、ERK シグナルと PI3K/Akt シグナルは、eNSPCs の神経分化に伴って活性化が上昇するが、この上昇を CORT が抑制することが明らかになった。

Figure 3-5

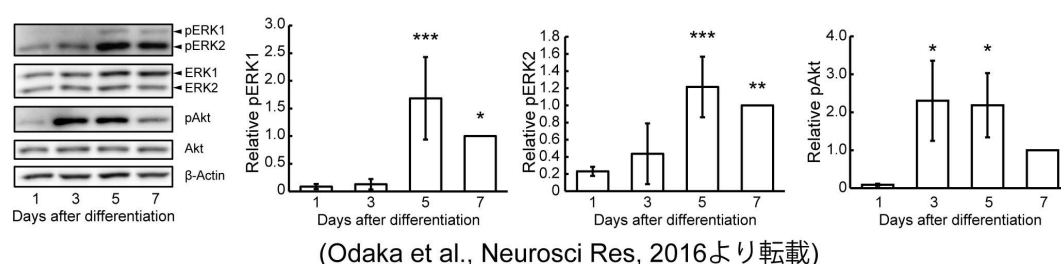


Figure 3-5. eNSPCs の神経分化に伴う ERK1/2 と Akt のリン酸化状態の変化

神経分化の条件下における eNSPCs を用いて、WB による ERK1/2 と Akt のリン酸化状態を解析した。各タンパク質のリン酸化フォーム (pERK1/2、pAkt) を検出後、メンブレン上の抗体のストリッピングを行い、新たに同一のメンブレンでトータルフォーム (ERK1/2、Akt) を認識する抗体による標識を行った (n=3-4)。*** P<0.001、** P<0.01、* P<0.05 vs Day 1.

Figure 3-6

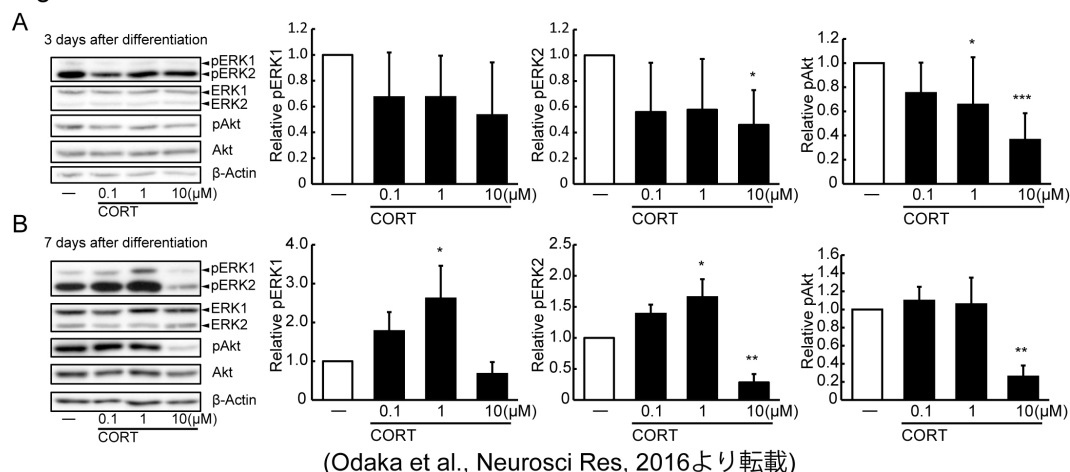


Figure 3-6. CORT 曝露が ERK1/2 と Akt のリン酸化に与える影響

神経分化誘導中の eNSPCs に対し、CORT (0.1-10 μ M) を投与した。(A) 誘導後 3 日目の ERK1/2 と Akt のリン酸化状態を WB により解析した (n=3-9)。(B) 誘導後 7 日目にお

る pERK1/2 と pAkt を検出・定量した (n=3-9)。*** P<0.001、** P<0.01、* P<0.05 vs CORT 未投与群。

3-4-5. ERK シグナルの活性化は細胞の生存を、Akt シグナルの活性化は神経分化と細胞の生存の双方に重要である

ERK と Akt シグナルの活性化因子は、神経分化と生存を促進することで知られるが、本研究で見いだされた神経分化誘導に伴う両シグナルの活性化の役割は不明である。そこで、各シグナルの阻害剤が、神経分化と細胞の生存に与える影響を調べることにした。ERK1/2 をリン酸化するキナーゼである MEK1/2 の阻害剤 U0126 は、誘導後 3 日目と 7 日目において、ERK1/2 のリン酸化を抑制することを確認した (Fig.3-7A、B)。また、誘導後 7 日目において U0126 による GAD65/67 の発現減少が認められたが、他のマーカー分子への影響は見られなかった (Fig.3-7A、B)。一方で、細胞生存率は、誘導後 7 日目において有意な減少を示した (Fig.3-7E)。続いて、Akt の上流分子である PI3K の阻害剤 LY294002 の投与を行った。LY294002 投与群では、誘導後 3 日目と 7 日目において、pAkt の減少が確認された (Fig.3-7C、D)。また、この誘導後 3 日目と 7 日目いずれにおいても、神経細胞およびシナプスマーカー (DCX、Syntaxin、GAD65/67) の発現減少が認められるのに対し、アストロサイトマーカー (GFAP) は誘導後 3 日目でのみ発現減少を確認した (Fig.3-7C、D)。細胞生存率では、誘導後 3 日目と 7 日目のいずれにおいても有意な減少を認めた (Fig.3-7E)。以上の結果から、ERK シグナルは細胞の生存に、Akt シグナルは神経分化と細胞の生存に寄与していることが示唆された。

Figure 3-7

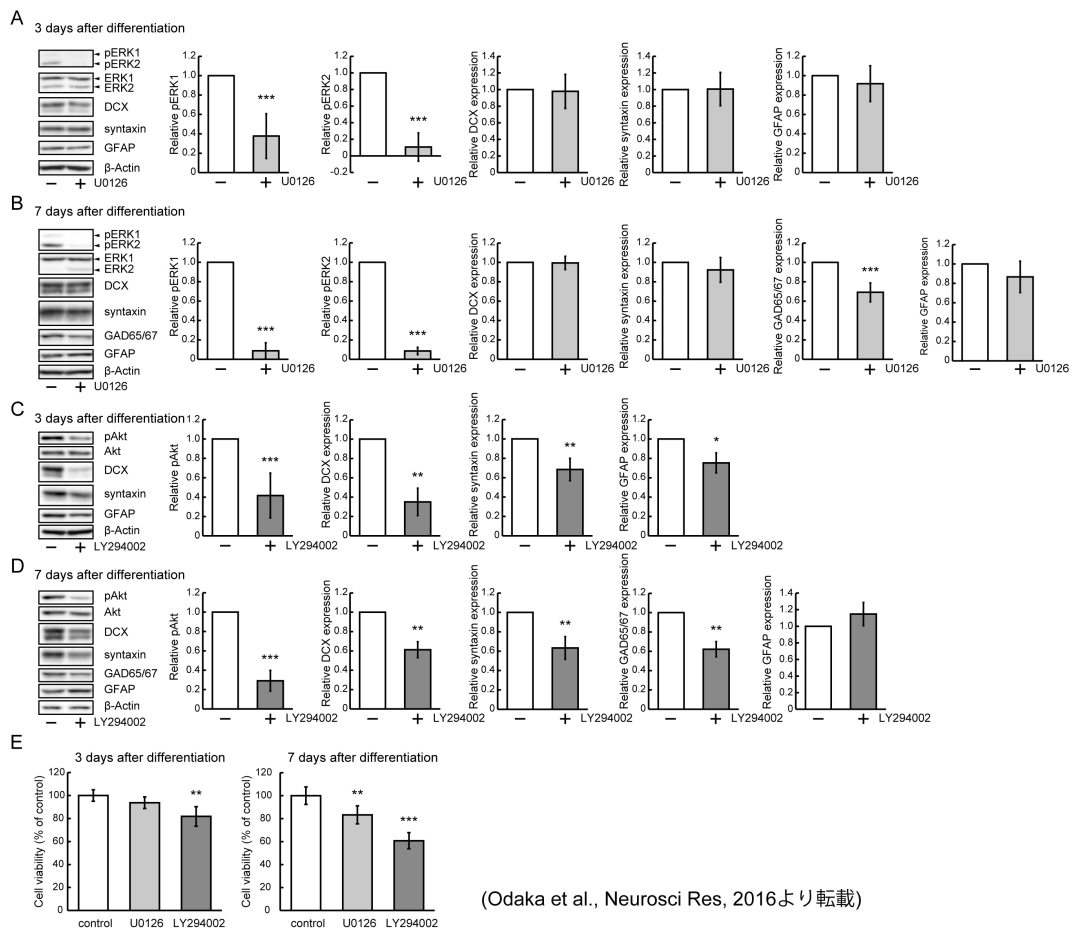


Figure 3-7. ERK シグナルと Akt シグナルの阻害剤が eNSPCs の分化に与える影響

分化誘導後 1 日目に、U0126 (10 μ M) または LY294002 (10 μ M) を投与した。(A) (B) 誘導後 3 日目 (A) と 7 日目 (B) における ERK1/2 のリン酸化状態と各種マーカータンパク質の発現を WB により検出・定量した (n=4-5)。*** P<0.001 vs U0126 未投与群 (C)

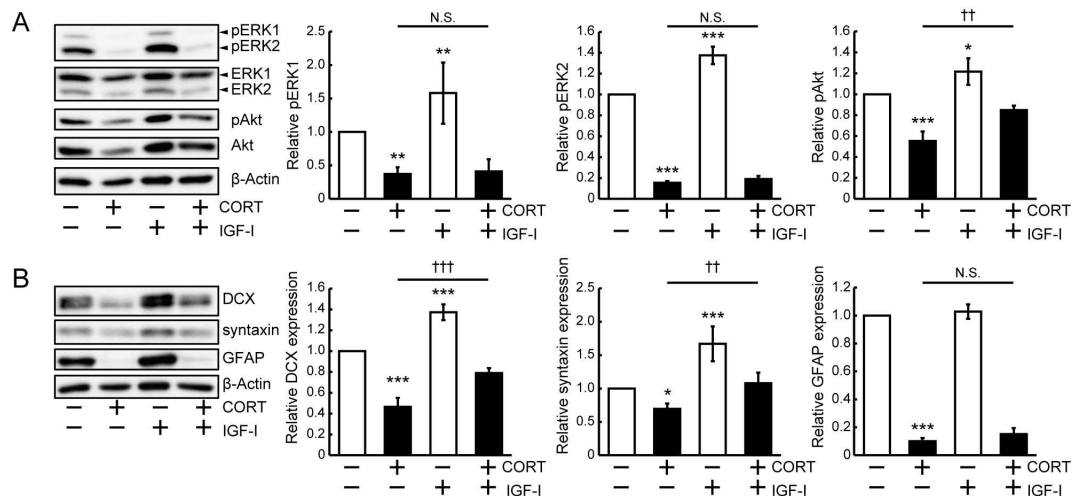
(D) 誘導後 3 日目 (C) と 7 日目 (D) の pAkt とマーカータンパク質の発現レベルを解析した (n=3-5)。*** P<0.001、** P<0.01、* P<0.05 vs LY294002 未投与群. (E) 誘導後 3 日目と 7 日目の細胞生存率を MTT assay により解析した (n=6)。*** P<0.001、** P<0.01 vs control.

3-4-6. IGF-I による Akt 活性化の促進と、CORT による神経分化障害の是正

CORT による神経分化障害と ERK・Akt シグナルの活性抑制との関係を明らかにするために、両シグナルの活性化因子のひとつである IGF-I によるレスキュー実験を行った。IGF-I 単独投与群では、未投与群に比べ、pERK1/2 と pAkt が上昇した (Fig.3-8A)。しかし、CORT の存在下では、IGF-I による ERK1/2 のリン酸化亢進は認められず、Akt のリン酸化のみが CORT 単独投与に比べて有意な上昇を示した (Fig.3-8A)。また、IGF-I 投与は、CORT の有無に関わらず、DCX と Syntaxin の発現を増加させたが、GFAP の発現には影響を与えなかった (Fig.3-8B)。すな

わち、eNSPCs の神経分化では Akt シグナルが重要な働きをしており、CORT 曝露による神経分化障害は、同シグナルの活性化により改善できる可能性がある。

Figure 3-8



(Odaka et al., Neurosci Res, 2016より転載)

Figure 3-8. IGF-I 投与が CORT による神経分化障害に与える影響

神経分化誘導中の eNSPCs に対して CORT (10 μ M) を投与し、誘導後 1 日目にさらに IGF-I (100 ng/ml) を添加した。(A) 誘導後 7 日目における ERK1/2 と Akt のリン酸化レベルを WB により解析した (n=3-4)。*** P<0.001、** P<0.01 vs CORT、IGF-I 未投与群。†† P<0.01 (B) 誘導後 7 日目のマーカータンパク質の発現レベルを示した (n=4)。*** P<0.001、* P<0.05 vs CORT、IGF-I 未投与群。††† P<0.001 †† P<0.01

3-5. 考察

3-5-1. GC による神経分化抑制作用と GC の低親和性受容体 GR

げっ歯類における内在性の GC である CORT は、二種類の受容体 (MR、GR) に対して結合する。GR の CORT に対する親和性は MR に比べ低いため、ストレスなどで血中 CORT 濃度が上昇した状況下において、GR は CORT と結合し活性化すると考えられている (De kloet et al., 1998)。本研究で明らかとなった CORT による神経分化抑制作用は、 $10\ \mu\text{M}$ と高濃度の CORT を曝露した場合にのみ観察されることから、これらの作用には GR が主として関与すると考えられる

(Fig.3-3)。GR の関与を調べるため、GR アンタゴニストである RU-486 による阻害実験を試みたが、RU-486 の単独投与により eNSPCs の細胞死を誘導することがわかり、検証することができなかった (data not shown)。そこで、GR に特に高い親和性を持つ合成 GC である DEX が、CORT と同様の作用を示すか検証したところ、CORT より低濃度 ($0.1\text{--}10\ \mu\text{M}$) で神経分化抑制作用を有することを確認できた (Fig.3-4)。DEX の GR への親和性が、CORT に比べ約 30 倍であることを考慮すると (Kawata, 1995)、GC による神経分化抑制作用は GR を介する作用であることが示唆された。

近年、細胞質に存在し、転写因子として働く古典的な GR (cGR) の他に、細胞膜に局在し、細胞内シグナル経路を活性化する membrane-bound GR (mGR) の存在が報告されている。GCs には、投与後、数分から数時間と短いタイムスケールで起こる早い作用 (細胞骨格の変化や膜受容体のエンドサイトーシスなど) が存在する (Tasker et al., 2006)。mGR は、cAMP-PKA 経路や PKC 経路といった G タンパク質共役受容体の下流経路を活性化することで、そうした GCs の早い作用を仲介していると考えられている (Yang et al., 2013)。mGR は、Akt や ERK、p38、JNK シグナルを活性化するが、こうしたシグナルの活性化は GC の投与後、数時間以内に起きる (Tasker et al., 2006)。今回の実験では、3 日間から 7 日間と慢性的に GCs を投与した後のシグナル系への影響を解析しているため、mGR による直接的なシグナル変化の影響は少ないと考えられる。一方で、mGR によるシグナルの変化が、転写活性を変化させ、シグナル伝達系に長期的な影響を与える可能性は否定できないため、検証の必要があると思われる。

3-5-2. 神経分化と ERK・PI3K/Akt シグナル

ERK と PI3K/Akt シグナルの活性化因子を培地中に添加することで、NSPCs の分化や生存が促進することは、多くの研究から明らかである (Ishii et al., 2010; Liu et al., 2014; Nguyen et al., 2009; Qiao et al., 2012)。本研究では、そうした神経分化を促進する因子を含まない分化誘導培地を用いて、NSPCs の自発性分化を促した。興味深いことに、こうした自発性の分化過程においても、ERK1/2 と Akt が顕著に

活性化することが明らかとなった (Fig.3-5)。ERK シグナル阻害剤 (U0126) の投与が、細胞生存率を低下させることから、分化に伴う ERK シグナルの活性化は、分化過程にある細胞の生存維持に必要であることが示唆された (Fig.3-7)。また、U0126 が DCX や Syntaxin、GFAP といったマーカー分子の発現に影響することなく、GAD65/67 の発現のみを低下させたことから、GABA 作動性神経細胞への分化・成熟に特異的に関与している可能性がある (Fig.3-7)。これらの表現型は、誘導後 7 日目に観察され、ERK1/2 のリン酸化亢進が誘導後 5-7 日目に生じていることとよく一致している。一方で、PI3K/Akt シグナル阻害剤 (LY294002) は、誘導後 3 日目と 7 日目の細胞生存率と、さらに神経細胞・シナプスマーカーの発現を減少させることから、この Akt シグナル活性は、神経分化と生存に寄与すると考えられる (Fig.3-7)。これも、Akt のリン酸化上昇が 3-5 日目と早期から生じていることとよく一致している。以上の結果から、分化過程で生じる ERK と PI3K/Akt シグナルの活性化は、これらのシグナル活性化因子を外から添加した場合と同様に、神経分化・生存に極めて重要であることが分かった。このことから、自発的な分化過程における ERK および PI3K/Akt シグナルの活性化は、シグナル活性化因子のオートクラインまたはパラクラインにより生じている可能性が考えられる。

3-5-3. GCs と ERK・PI3K/Akt シグナル

GCs による ERK・PI3K/Akt シグナルの抑制作用は、骨芽細胞や筋芽細胞、卵母細胞など様々な細胞種で報告されており、我々も神経細胞において、脳由来神経栄養因子 (BDNF) による ERK シグナルの活性化が抑制されることを報告している (Sandari et al., 2004; Smith et al., 2005; Horsch et al., 2007; Gonzalez et al., 2010; Kumamaru et al., 2011)。しかし、これまで eNSPCs に対する GCs の影響は調べられていなかった。本研究において、CORT が、神経分化中の eNSPCs における両シグナルの活性化を抑制することが明らかとなった。このシグナル抑制作用は、10 μ M の CORT 投与時に生じるが、これは、神経分化抑制作用が生じる濃度と一致している (Fig.3-6)。GCs が eNSPCs のシグナル活性化を抑制するメカニズムはまだ不明であるが、他の細胞種を用いた先行研究では、受容体チロシンキナーゼ (RTKs) によるシグナル活性化作用を GCs が阻害することは報告されている (Kumamaru et al., 2011; Kuo et al., 2012; Zou et al., 2015)。神経細胞を用いた先行研究では、GCs が、BDNF の RTK である TrkB と ERK シグナルを活性化する Shp2 の結合を阻害することで、BDNF による ERK シグナルの活性化を阻害することが報告されている (Kumamaru et al., 2011)。GCs による Akt シグナルの抑制は、骨芽細胞と筋芽細胞において報告されている (Kuo et al., 2012; Zou et al., 2015)。これらの細胞種では、GCs が p85 α モノマーの発現を上昇させることで、RTKs と p110/p85 ヘテロダイマーの結合を競合阻害し、その結果として下流にある Akt シグナルの活性化が阻害される。本研究では、RTKs である Type I IGF 受容体を活性

化する IGF-I を投与し、レスキュー実験を行ったが、CORT 曝露下において IGF-I による pERK1/2 の上昇がみられなかった (Fig.8a)。これは、CORT が RTKs による ERK のシグナル活性化経路を阻害しているためである可能性がある。一方で、Akt のリン酸化は、CORT 曝露下でも IGF-I により上昇した (Fig.8a)。CORT による pAkt の減少は、RTKs を介したものと別のメカニズムを介している可能性がある。今後、先行研究で報告されたような分子機構が eNSPCs においても寄与しているのか、更に検証する必要があるだろう。

3-5-4. アストロサイト分化と GCs

先行研究において、妊娠期の羊に対する GCs の投与が胎児脳の GFAP の発現を減少させ、アストロサイトによる血管密着結合の成熟を遅らせることが報告されている (Huang et al., 2001)。本実験系においても、GC は神経細胞マーカーだけでなく、GFAP の発現も減少させた (Fig. 3-3)。神経細胞マーカーと異なり、GFAP の発現減少は、Akt や ERK シグナルが抑制される 10 μ M より低濃度の CORT でも起きており、また、シグナル阻害剤や IGF-I の投与も GFAP の発現には、3 日目の LY294002 群を除き、影響が見られなかった (Fig.3-3、3-7、3-8)。このことから、GCs による GFAP の発現減少には、ERK1/2 や Akt の活性減少とは別のメカニズムが存在していると考えられる。GFAP のプロモーター上には、GR の結合ドメイン (GRE) が存在することから、GR により直接、発現制御を受けている可能性が考えられる (Gomes et al., 1999)。今後、この GRE が、実際に GFAP の発現をネガティブに制御しているのか検証する必要がある。

3-5-5. PI3K/Akt シグナルと Wnt・Hedgehog シグナル

これまでの研究から、GCs による神経新生の障害に、Wnt シグナルと Hedgehog シグナルの抑制効果が関与している可能性が示唆されている (Moors et al., 2012; Anacker et al., 2013)。これらのシグナル経路に加え、今回新たに、GCs による PI3K/Akt シグナル経路の阻害作用が神経分化抑制に寄与する可能性が明らかとなった。PI3K/Akt シグナルには、様々な下流経路が存在する。興味深いことに、Wnt シグナルのカノニカル経路である Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) / β -catenin 経路が、Akt により調整されることが知られている。pAkt は GSK-3 β をリン酸化し、そのキナーゼ活性を抑制することで、 β -catenin の分解を阻害し、 β -catenin による転写を誘導する (Katoh et al., 2006)。さらに、GSK-3 β は hedgehog シグナルの下流分子である Gli を抑制的に制御するため、Wnt や Akt による GSK-3 β の不活化は、hedgehog シグナルを増強することも報告されている (Pan et al., 2006)。この PI3K/Akt/GSK-3 β 経路は、脳外傷を負った際に活性化され、成体神経新生を促進することから、神経新生への重要性が示唆されている (Kisoh et al., 2017)。また、実際に、骨芽様細胞を用いた実験系にて、GCs が PI3K/Akt/GSK-3 β / β -catenin 経路

を抑制することが報告されている (Smith et al., 2005)。さらに、GSK-3 β 以外に、神経新生に関与する Akt の下流ターゲットのひとつとして、mTOR が挙げられる。mTOR complex1 は Akt により活性化し、さらに下流の p70S6K1/2 と eIF4E の活性化を介して転写活性を調整する (Wang et al., 2017)。PI3K/Akt/mTOR 経路は正常な脳発達に不可欠なシグナル経路であり、mTOR の欠損は、NSPCs の自己複製と神経分化を障害し、小頭症を発症させる (Ka et al., 2014; Wang et al., 2017)。驚くべきことに、mTOR の活性も GSK3 β により抑制的に制御されるため、GSK-3 β の不活化は mTOR シグナルを増強する (Ka et al., 2014)。このように、GCs のターゲットとなる PI3K/Akt・Wnt・Hedgehog シグナルの下流において、GSK-3 β を介する多様なシグナル伝達のクロストークが存在する。GCs の神経分化抑制作用の詳細を知るには、こうしたシグナル伝達経路クロストークのひとつひとつがどのように神経新生に寄与しているのか、今後のさらなる解析を必要とする。

3-5-6. IGF-I と GCs

IGF-I は、RTKs である Type I IGF 受容体の活性化と、それに伴う ERK・PI3K/Akt シグナルの活性化を介して、NSPC の増殖・生存、神経分化、およびシナプス形成を促進する (Ye and D'Ercole., 2006; Bondy and Cheng., 2004)。IGF-I は末梢投与においても重篤な副作用の少ない因子とされており、血液脳関門を通過して脳に到達するため、神経発達障害の薬剤候補として注目されている (Vahdatpour et al., 2016)。現在、遺伝性の神経発達障害である Rett 症候群を対象とした IGF-I の治験が行われている。Rett 症候群は、遺伝子変異による methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) の機能欠失により発症し、精神運動発達遅滞と自閉症状を呈する。注目すべきことに、動物モデルとヒト多能性幹細胞由来神経細胞の解析により、Rett 症候群の神経細胞では、PI3K/Akt/mTOR 経路の活性減少が生じ、シナプス形成が障害されていることが明らかとなっている (Ricciardi S et al., 2011; Li Y et al., 2013)。さらに、IGF-I の投与が、Rett 症候群モデル動物におけるシナプス障害と行動学的異常を改善することが報告されている (Castro et al., 2014)。これら一連の研究は、特定のシグナル異常が神経障害と行動学的異常の原因となり得ることを示しており、さらには、細胞内シグナル調整を基盤とした治療の有効性を示唆している。本研究では、神経発達障害の環境要因のひとつである GC 曝露が、Rett 症候群と同様、Akt シグナルの活性減少と、神経・シナプスマーカーの減少を引き起こすことを見出した。また、それらの神経障害が、IGF-I 投与により改善することを示した。将来的には、Rett 症候群や、本研究で見いだされた GC 曝露による Akt シグナルの活性低下を基調病態とする他の神経発達障害においても研究を進めることで、例えば IGF-I 投与など、共通の細胞内シグナル改善を目的とした治療法の開発が可能となるかもしれない。

第4章：総括

最後に、本研究の成果と今後の展望について述べる。

第2章では、酸化ストレス曝露で引き起こされる ERK および p38 シグナル経路の活性化が、密接に神経細胞死に関与していることを示した。さらに、カベルゴリンがこれらのシグナルを抑制し、神経保護作用を発揮することを明らかにした。すなわち、酸化ストレスが病態に寄与していることで知られる AD や PD などの神経変性疾患における ERK および p38 シグナル経路の重要性、そして、これらシグナルの抑制効力を持つカベルゴリンの AD 治療薬としての有用性を示唆した。

第3章では、GC 曝露が、神経分化に伴う ERK および PI3K/Akt シグナル経路の活性を抑制し、結果的に神経分化と生存を障害することを明らかにした。また、PI3K/Akt の活性化因子である IGF-I の投与により、GC 曝露による神経分化障害が改善することを明らかにした。これらの結果は、神経発達障害の環境要因である GC の曝露の悪影響を細胞レベルで明らかにし、PI3K/Akt シグナルが治療のターゲットとして有効である可能性を示唆している。

本研究では、神経疾患病態を再現した2つの *in vitro* モデル系を用いて、細胞内シグナル伝達の異常が、細胞障害の原因となっていることを明らかにした。また、そうしたシグナル伝達異常を是正することで、障害を改善することができる可能性を示した。これらのモデル系において、共通して変動が見られたシグナル経路として、ERK シグナル経路が見出された。酸化ストレス曝露と神経分化誘導のいずれにおいても、ERK シグナルの活性化が顕著であるが、前者では細胞死を誘導するのに対し、後者では細胞生存を促進しており、正反対の役割を果たしていることが分かった。今後、細胞内シグナル伝達異常と神経障害の関係を解析する上で、細胞外刺激の違いに応じて、同一の細胞内シグナルが、異なる表現型を誘導する分子メカニズムを解明する必要がある。特に、ERK シグナルは神経栄養因子や増殖因子、炎症反応など様々な条件で活性化することが知られているため、このメカニズムの詳細は、病理学的、生理学的にも極めて重要である。

神経疾患には、遺伝的要因と環境的要因が複合的に作用し、いわゆる多因子疾患として病態が発現するものが多い。本研究では、神経発達障害の環境的要因の一つとして GC の胎生曝露に着目し、神経障害の *in vitro* モデルを作成した。興味深いことに、遺伝的要因 (MeCP2 遺伝子の変異) により神経発達障害を発症する Rett 症候群において、PI3K/Akt シグナル抑制による神経分化障害および、IGF-I 投与による表現型改善が報告されている (Ricciardi S et al., 2011; Li Y et al., 2013; Castro et al., 2014)。これは、異なる要因であっても (GC 曝露、または MeCP2 遺伝子変異)、共通の細胞内シグナル伝達異常に集約されることで、同じ病態を引き起こす可能性を示唆している。特に、細胞内シグナル伝達の異常は、疾患病態と関連した細胞障害の直接的原因となり得るため、多因子疾患において共通した細胞病態

を探索する際の、重要な候補の一つであると言える。今後、神経疾患の様々な発症モデルにおいて、細胞内シグナル伝達に着目した解析を行い、異なるモデル間で共通するシグナル異常を見出すことで、新たな治療ターゲットの発見が期待できるだろう。

謝辞

本論文の執筆および研究へのご指導、ご助言を賜りました早稲田大学 理工学術院 教授 井上貴文先生に、心より感謝致します。

本研究の遂行および論文の執筆に関して、ご指導ご鞭撻を頂きました国立精神・神経医療研究センター 疾病研究第3部 室長 沼川忠弘先生、同部長 功刀浩先生に深く御礼申し上げます。

最後に本研究を進める上で、惜しみない協力と活発な議論をして頂きました早稲田大学および疾病研究第3部の諸先生方、職員の方および同期の方に感謝致します。

参考文献

- Almeida RD, Manadas BJ, Melo CV, Gomes JR, Mendes CS, Grãos MM, Carvalho RF, Carvalho AP, Duarte CB (2005) Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death Differ.* 12, 1329-1343.
- Alonso, S.J., Arevalo, R., Afonso, D., Rodríguez, M (1991) Effects of maternal stress during pregnancy on forced swimming test behavior of the offspring. *Physiol.Behav.* 50, 511–517.
- Anacker C, Cattaneo A, Luoni A, Musaelyan K, Zunszain PA, Milanese E, Rybka J, Berry A, Cirulli F, Thuret S, Price J, Riva MA, Gennarelli M, Pariante CM (2013) Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology.* 38, 872-883.
- Anand A, Patience AA, Sharma N, Khurana N. (2017) The present and future of pharmacotherapy of Alzheimer's disease: A comprehensive review. *Eur J Pharmacol.* 815, 364-375.
- Anekonda TS, Quinn JF. (2011) Calcium channel blocking as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: the case for isradipine. *Biochim Biophys Acta.* 1812, 1584-1590.
- Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, Palmieri G, Testori A, Marincola FM, Mozzillo N (2012) The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med.* 10, 85.
- Barber SC, Shaw PJ. (2010) Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med.* 48, 629–641.
- Baas HK, Schueler P. (2001) Efficacy of cabergoline in long-term use: results of three observational studies in 1,500 patients with Parkinson's disease. *Eur Neurol.* 46, 18–23.
- Barbazanges A, Piazza PV, Le Moal M, Maccari S. (1996) Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J Neurosci.* 16, 3943-3949.
- Bergman K, Sarkar P, Glover V, O'Connor TG. (2010) Maternal prenatal cortisol and infant cognitive development: moderation by infant-mother attachment. *Biol Psychiatry.* 67, 1026-1032.
- Biglan KM, Oakes D, Lang AE, Hauser RA, Hodgeman K, Greco B, Lowell J, Rockhill R, Shoulson I, Venuto C, Young D, Simuni T. (2017) A novel design of a Phase III trial of isradipine in early Parkinson disease (STEADY-PD III). *Ann Clin Transl Neurol.* 4, 360-368.
- Bingham, B.C., Rani, C.S.S., Frazer, A., Strong, R., Morilak, D.A (2013) Exogenous

- prenatal corticosterone exposure mimics the effects of prenatal stress on adult brain stress response systems and fear extinction behavior. *Psychoneuroendocrinology*. 38, 2746-2757.
- Bolten MI, Wurmser H, Buske-Kirschbaum A, Papoušek M, Pirke KM, Hellhammer D. (2011) Cortisol levels in pregnancy as a psychobiological predictor for birth weight. *Arch Womens Ment Health*. 14, 33-41.
- Bondy CA, Cheng CM. (2004) Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *Eur J Pharmacol*. 490, 25-31.
- Braun T, Challis JR, Newnham JP, Sloboda DM (2013) Early-life glucocorticoid exposure: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, placental function, and long-term disease risk. *Endocr Rev*. 34, 885-916.
- Buss C, Davis EP, Muftuler LT, Head K, Sandman CA. (2010) High pregnancy anxiety during mid-gestation is associated with decreased gray matter density in 6-9-year-old children. *Psychoneuroendocrinology*. 35, 141-153.
- Castro J, Garcia RI, Kwok S, Banerjee A, Petravic J, Woodson J, Mellios N, Tropea D, Sur M. (2014) Functional recovery with recombinant human IGF1 treatment in a mouse model of Rett Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111, 9941-9946.
- Chau KY, Korlipara LV, Cooper JM, Schapira AH. (2009) Protection against paraquat and A53T alpha-synuclein toxicity by cabergoline is partially mediated by dopamine receptors. *J Neurol Sci*. 278, 44-53.
- Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Yoon HS, Kunugi H. (2010) Cabergoline, a dopamine receptor agonist, has an antidepressant-like property and enhances brain-derived neurotrophic factor signaling. *Psychopharmacology (Berl)*. 211, 291-301.
- Choi DW. (1995) Calcium still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci*. 18, 58-60.
- Crino PB, Jin H, Shumate MD, Robinson MB, Coulter DA, Brooks-Kayal AR. (2002) Increased expression of the neuronal glutamate transporter (EAAT3/EAAC1) in hippocampal and neocortical epilepsy. *Epilepsia*. 43, 211-218.
- Crossthwaite AJ, Hasan S, Williams RJ. (2002) Hydrogen peroxide-mediated phosphorylation of ERK1/2, Akt/PKB and JNK in cortical neurones: dependence on Ca(2+) and PI3-kinase. *J Neurochem*. 80, 24-35.
- Crowther CA, Doyle LW, Haslam RR, Hiller JE, Harding JE, Robinson JS; ACTORDS Study Group (2007) Outcomes at 2 years of age after repeat doses of antenatal corticosteroids. *N Engl J Med*. 357, 1179-1189.
- Curran MP, Perry CM. (2004) Cabergoline : a review of its use in the treatment of Parkinson's disease. *Drugs*. 64, 2125-2141.
- Dedovic K, Ngiam J. (2015) The cortisol awakening response and major depression:

- examining the evidence. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 11, 1181-1189.
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev.* 19, 269-301.
- Enslen H, Tokumitsu H, Stork PJ, Davis RJ, Soderling TR. (1996) Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 10803-10808.
- Entringer S, Buss C, Kumsta R, Hellhammer DH, Wadhwa PD, Wüst S. (2009) Prenatal psychosocial stress exposure is associated with subsequent working memory performance in young women. *Behav Neurosci.* 123, 886-893.
- Fan LW, Pang Y. (2017) Dysregulation of neurogenesis by neuroinflammation: key differences in neurodevelopmental and neurological disorders. *Neural Regen Res.* 12, 366-371.
- Feelders RA, Hofland LJ. (2013) Medical treatment of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 98, 425-438.
- Feld M, Krawczyk MC, Sol Fustiñana M, Blake MG, Baratti CM, Romano A, Boccia MM. (2014) Decrease of ERK/MAPK overactivation in prefrontal cortex reverses early memory deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 40, 69-82.
- Feng Y, Wang X. (2012) Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2012, 472932.
- French NP, Hagan R, Evans SF, Mullan A, Newnham JP (2004) Repeated antenatal corticosteroids: effects on cerebral palsy and childhood behavior. *Am J Obstet Gynecol.* 190, 588-595.
- Gan X, Huang S, Wu L, Wang Y, Hu G, Li G, Zhang H, Yu H, Swerdlow RH, Chen JX, Yan SS. (2014) Inhibition of ERK-DLP1 signaling and mitochondrial division alleviates mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease cybrid cell. *Biochim Biophys Acta.* 1842, 220-231.
- Goedhart G, Vrijkotte TG, Roseboom TJ, van der Wal MF, Cuijpers P, Bonse GJ. (2010) Maternal cortisol and offspring birthweight: results from a large prospective cohort study. *Psychoneuroendocrinology.* 35, 644-652.
- Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V (1999) Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res.* 32, 619-631.
- González R, Ruiz-León Y, Gomendio M, Roldan ER (2010) The effect of glucocorticoids on ERK-1/2 phosphorylation during maturation of lamb oocytes and their subsequent fertilization and cleavage ability in vitro. *Reprod Toxicol.* 29, 198-205.
- Guillet B, Lortet S, Masmejean F, Samuel D, Nieoullon A, et al. (2002) Developmental

- expression and activity of high affinity glutamate transporters in rat cortical primary cultures. *Neurochem Int.* 40, 661–671.
- Hauser DN, Hastings TG. (2013) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol Dis.* 51, 35–42.
- Himi T, Ikeda M, Yasuhara T, Nishida M, Morita I. (2003) Role of neuronal glutamate transporter in the cysteine uptake and intracellular glutathione levels in cultured cortical neurons. *J Neural Transm.* 110, 1337–1348.
- Horsch K, de Wet H, Schuurmans MM, Allie-Reid F, Cato AC, Cunningham J, Burrin JM, Hough FS, Hulley PA (2007) Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1/dual specificity phosphatase 1 mediates glucocorticoid inhibition of osteoblast proliferation. *Mol Endocrinol.* 21, 2929–2940.
- Huang WL, Harper CG, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. (2001) Repeated prenatal corticosteroid administration delays astrocyte and capillary tight junction maturation in fetal sheep. *Int J Dev Neurosci.* 19, 487–493.
- Jackson DM, Westlind-Danielsson A. (1994) Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther.* 64, 291–370.
- Jara JH, Singh BB, Floden AM, Combs CK (2007) Tumor necrosis factor alpha stimulates NMDA receptor activity in mouse cortical neurons resulting in ERK-dependent death. *J Neurochem.* 100, 1407–1420.
- Ji YF, Zhou L, Xie YJ, Xu SM, Zhu J, Teng P, Shao CY, Wang Y, Luo JH, Shen Y. (2013) Upregulation of glutamate transporter GLT-1 by mTOR-Akt-NF- κ B cascade in astrocytic oxygen-glucose deprivation. *Glia.* 61, 1959–1975.
- Johnson GL, Lapadat R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 298, 1911–1912.
- Johri A, Beal MF. (2012) Antioxidants in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1822, 664–674.
- Irving EA, Bamford M. (2002) Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22, 631–647.
- Ishii S, Okada Y, Kadoya T, Matsuzaki Y, Shimazaki T, Okano H. (2010) Stromal cell-secreted factors promote the survival of embryonic stem cell-derived early neural stem/progenitor cells via the activation of MAPK and PI3K-Akt pathways. *J Neurosci Res.* 88, 722–734.
- Kalampokas T, Creatsas G, Kalampokas E. (2013) Cabergoline as treatment of ovarian hyperstimulation syndrome: a review. *Gynecol Endocrinol.* 29, 98–100.
- Kaneko T, Fujiyama F. (2002) Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neurosci Res.* 42, 243–250.

- Katoh M, Katoh M (2006) Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3 β to regulate β -catenin and SNAIL signaling cascades. *Cancer Biol Ther.* 5, 1059-1064.
- Katz M, Amit I, Yarden Y (2007) Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1773, 1161-1176.
- Kisoh K, Hayashi H, Itoh T, Asada M, Arai M, Yuan B, Tanonaka K, Takagi N (2017) Involvement of GSK-3 β Phosphorylation Through PI3-K/Akt in Cerebral Ischemia-Induced Neurogenesis in Rats. *Mol Neurobiol.* 54, 7917-7927.
- Ka M, Condorelli G, Woodgett JR, Km WY (2014) mTOR regulates brain morphogenesis by mediating GSK3 signaling. *Development.* 141, 4076-4086.
- Kanagawa, T., Tomimatsu, T., Hayashi, S., Shioji, M., Fukuda, H., Shimoya, K., Murata, Y (2006) The effects of repeated corticosteroid administration on the neurogenesis in the neonatal rat. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194, 231–238.
- Kawata M. (1995) Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neurosci. Res.* 24, 1–46.
- Khan ZU, Koulen P, Rubinstein M, Grandy DK, Goldman-Rakic PS. (2001) An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 1964-1969.
- Kitamura Y, Kohno Y, Nakazawa M, Nomura Y. (1997) Inhibitory effects of talipexole and pramipexole on MPTP-induced dopamine reduction in the striatum of C57BL/6N mice. *Jpn J Pharmacol.* 74, 51-57.
- Kitamura Y, Kosaka T, Kakimura JI, Matsuoka Y, Kohno Y, Nomura Y, Taniguchi T. (1998) Protective effects of the antiparkinsonian drugs talipexole and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol.* 54, 1046-1054.
- Kuo T, Lew MJ, Mayba O, Harris CA, Speed TP, Wang JC (2012) Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 11160-11165.
- Kvernmo T, Hartter S, Burger E. (2006) A review of the receptor-binding and pharmacokinetic properties of dopamine agonists. *Clin Ther.* 28, 1065–1078.
- Lee Y, Aono M, Laskowitz D, Warner DS, Pearlstein RD. (2004) Apolipoprotein E protects against oxidative stress in mixed neuronal-glial cell cultures by reducing glutamate toxicity. *Neurochem Int.* 44, 107–118.
- Liu F, Xuan A, Chen Y, Zhang J, Xu L, Yan Q, Long D. (2014) Combined effect of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor on neuronal

- differentiation of neural stem cells and the potential molecular mechanisms. *Mol Med Rep.* 10, 1739-1745.
- Li Y, Gonzalez P, Zhang L. (2012) Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: mechanisms and possible interventions. *Prog Neurobiol.* 98, 145-165.
- Li Y, Wang H, Muffat J, Cheng AW, Orlando DA, Lovén J, Kwok SM, Feldman DA, Bateup HS, Gao Q, Hockemeyer D, Mitalipova M, Lewis CA, Vander Heiden MG, Sur M, Young RA, Jaenisch R. (2013) Global transcriptional and translational repression in human-embryonic-stem-cell-derived Rett syndrome neurons. *Cell Stem Cell.* 13, 446-458.
- Lombardi G, Varsaldi F, Miglio G, Papini MG, Battaglia A, et al. Cabergoline prevents necrotic neuronal death in an in vitro model of oxidative stress. *Eur J Pharmacol.* 457, 95–98.
- Lordi, B., Patin, V., Protais, P., Mellier, D., Caston, J (2000) Chronic stress in pregnant rats: effects on growth rate, learning, and memory capabilities of the offspring. *Int. J. Psychophysiol.* 37, 195–205.
- Lu Z, Xu S. (2006) ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life.* 58 621-631.
- Mailly F, Marin P, Israel M, Glowinski J, Premont J. (1999) Increase in external glutamate and NMDA receptor activation contribute to H₂O₂-induced neuronal apoptosis. *J Neurochem.* 73, 1181–1188.
- Mairesse J, Lesage J, Breton C, Bréant B, Hahn T, Darnaudéry M, Dickson SL, Seckl J, Blondeau B, Vieau D, Maccari S, Viltart O. (2007) Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292, E1526-E1533.
- Miglio G, Varsaldi F, Francioli E, Battaglia A, Canonico PL, et al. (2004) Cabergoline protects SH-SY5Y neuronal cells in an in vitro model of ischemia. *Eur J Pharmacol.* 489, 157–165.
- Moors M, Bose R, Johansson-Haque K, Edoff K, Okret S, Ceccatelli S. (2012) Dickkopf 1 mediates glucocorticoid-induced changes in human neural progenitor cell proliferation and differentiation. *Toxicol Sci.* 125, 488-495.
- Mueller D, Porter JT, Quirk GJ. (2008) Noradrenergic signaling in infralimbic cortex increases cell excitability and strengthens memory for fear extinction. *J Neurosci.* 28, 369-375.
- Munoz L, Ralay Ranaivo H, Roy SM, Hu W, Craft JM, McNamara LK, Chico LW, Van Eldik LJ, Watterson DM. (2007) A novel p38 alpha MAPK inhibitor suppresses brain proinflammatory cytokine up-regulation and attenuates

- synaptic dysfunction and behavioral deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neuroinflammation*. 4, 21.
- Nguyen N, Lee SB, Lee YS, Lee KH, Ahn JY. (2009) Neuroprotection by NGF and BDNF against neurotoxin-exerted apoptotic death in neural stem cells are mediated through Trk receptors, activating PI3-kinase and MAPK pathways. *Neurochem Res*. 34, 942-951.
- Noorlander, C.W., Tijsseling, D., Hessel, E.V.S., De Vries, W.B., Derks, J.B., Visser, G.H.A, De Graan, P.N.E (2014). Antenatal glucocorticoid treatment affects hippocampal development in mice. *PLOS ONE*. 9, e85671.
- Noorlander CW, Visser GH, Ramakers GM, Nikkels PG, de Graan PN (2008) Prenatal corticosteroid exposure affects hippocampal plasticity and reduces lifespan. *Dev Neurobiol*. 68, 237-246.
- Noriko O, Nannan G. Impaired Neurogenesis as a Risk Factor for Schizophrenia and Related Mental Diseases. *Neurogenesis in the Adult Brain II*. pp 109-131
- Numakawa T, Adachi N, Richards M, Chiba S, Kunugi H. (2013) Brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoids: reciprocal influence on the central nervous system. *Neuroscience*. 239, 157–172.
- Numakawa T, Matsumoto T, Numakawa Y, Richards M, Yamawaki S, Kunugi H. (2011) Protective Action of Neurotrophic Factors and Estrogen against Oxidative Stress-Mediated Neurodegeneration. *J Toxicol*. 2011, 405194.
- O'Donnell KJ, Bugge Jensen A, Freeman L, Khalife N, O'Connor TG, Glover V. (2012) Maternal prenatal anxiety and downregulation of placental 11 β -HSD2. *Psychoneuroendocrinology*. 37, 818-826.
- O'Neill MJ, Hicks CA, Ward MA, Cardwell GP, Reymann JM, Allain H, Bentué-Ferrer D. (1998) Dopamine D2 receptor agonists protect against ischaemia-induced hippocampal neurodegeneration in global cerebral ischaemia. *Eur J Pharmacol*. 352, 37-46.
- Pan Y, Bai CB, Joyner AL, Wang B (2006) Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol*. 26, 3365-3377.
- Peng S, Zhang Y, Zhang J, Wang H, Ren B. (2010) ERK in learning and memory: a review of recent research. *Int J Mol Sci*. 11, 222-232.
- Perry G, Roder H, Nunomura A, Takeda A, Friedlich AL, Zhu X, Raina AK, Holbrook N, Siedlak SL, Harris PL, Smith MA. (1999) Activation of neuronal extracellular receptor kinase (ERK) in Alzheimer disease links oxidative stress to abnormal phosphorylation. *Neuroreport*. 10, 2411-2415.
- Pradeep H, Diya JB, Shashikumar S, Rajanikant GK. (2012) Oxidative stress -assassin

- behind the ischemic stroke. *Folia Neuropathol.* 50, 219–230.
- Qiao J, Paul P, Lee S, Qiao L, Josifi E, Tiao JR, Chung DH. (2012) PI3K/AKT and ERK regulate retinoic acid-induced neuroblastoma cellular differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 424, 421–426.
- Resink A, Villa M, Boer GJ, Mohler H, Balazs R. (1995) Agonist-induced downregulation of NMDA receptors in cerebellar granule cells in culture. *Eur J Neurosci.* 7, 1700–1706.
- Ricciardi S, Boggio EM, Grosso S, Lonetti G, Forlani G, Stefanelli G, Calcagno E, Morello N, Landsberger N, Biffo S, Pizzorusso T, Giustetto M, Broccoli V. (2011) Reduced AKT/mTOR signaling and protein synthesis dysregulation in a Rett syndrome animal model. *Hum Mol Genet.* 20, 1182–1196.
- Romera C, Hurtado O, Botella SH, Lizasoain I, Cárdenas A, Fernández-Tomé P, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA. (2004) In vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor- α pathway. *J Neurosci.* 24, 1350–1357.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, et al. (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron.* 16, 675–686.
- Roy MS, Roy A, Gallucci WT, Collier B, Young K, Kamilaris TC, Chrousos GP. (1993) The ovine corticotropin-releasing hormone-stimulation test in type I diabetic patients and controls: suggestion of mild chronic hypercortisolism. *Metabolism.* 42, 696–700.
- Saito S, Kimura S, Adachi N, Numakawa T, Ogura A, Tominaga-Yoshino K. (2016) An in vitro reproduction of stress-induced memory defects: Effects of corticoids on dendritic spine dynamics. *Sci Rep.* 6, 19287.
- Salomon, S., Bejar, C., Schorer-Apelbaum, D., Weinstock, M (2011) Corticosterone mediates some but not other behavioural changes induced by prenatal stress in rats. *J. Neuroendocrinol.* 23, 118–128
- Samanta S, Perkinson MS, Morgan M, Williams RJ. (1998) Hydrogen peroxide enhances signal-responsive arachidonic acid release from neurons: role of mitogen-activated protein kinase. *J Neurochem.* 70, 2082–2090.
- Samatar AA, Poulikakos PI. (2014) Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 13, 928–942.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL (2004) Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 117, 399–412.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. (2000) How do glucocorticoids influence stress

- responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 21, 55-89.
- Sato T, Shimazaki T, Naka H, Fukami S, Satoh Y, Okano H, Lax I, Schlessinger J, Gotoh N. (2010) FRS2 α regulates Erk levels to control a self-renewal target Hes1 and proliferation of FGF-responsive neural stem/progenitor cells. *Stem Cells.* 28, 1661-1673.
- Sawamoto A, Okuyama S, Yamamoto K, Amakura Y, Yoshimura M, Nakajima M, Furukawa Y. (2016) 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone, a Citrus Flavonoid, Ameliorates Corticosterone-Induced Depression-like Behavior and Restores Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression, Neurogenesis, and Neuroplasticity in the Hippocampus. *Molecules.* 21, 541.
- Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M. (1996) Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 16, 6125–6133.
- Schneider, M.L., Moore, C.F., Kraemer, G.W., Roberts, A.D., DeJesus, O.T (2002) The impact of prenatal stress, fetal alcohol exposure, or both on development: perspectives from a primate model. *Psychoneuroendocrinology* 27, 285–298.
- Scholz H, Trenkwalder C, Kohnen R, Riemann D, Kriston L, et al. (2011) Dopamine agonists for restless legs syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 16, CD006009.
- Selye H. (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature.* 138, 32.
- Selye H. (1956) *The stress of life.* McGraw-Hill Book Co.
- Selye H. (1976) *Stress in health and disease* Butterworth's, Inc.
- Smith E, Frenkel B (2005) Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3 β -dependent and -independent manner. *J Biol Chem.* 280, 2388-2394.
- Smith SM, Vale WW. (2006) The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci.* 8, 383-395.
- Stanciu M, Wang Y, Kentor R, Burke N, Watkins S, et al. (2000) Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *J Biol Chem.* 275, 12200–12206.
- Sternberg EM. (2001) Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *J Endocrinol.* 169, 429-435.
- Streeten DH. (1993) Is hypothalamic-pituitary-adrenal hyperactivity important in the pathogenesis of excessive abdominal fat distribution? *J Clin Endocrinol Metab.* 77, 339-340.
- Surmeier DJ, Halliday GM, Simuni T. (2017) Calcium, mitochondrial dysfunction and slowing the progression of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 298, 202-209.
- Szabo S, Tache Y, Somogyi A. (2012) The legacy of Hans Selye and the origins of stress

- research: a retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the editor# of nature. *Stress*. 15, 472-478.
- Takeuchi Y, Fukunaga K. (2004) Different activation of NF-kappaB by stimulation of dopamine D2L and D2S receptors through calcineurin activation. *J Neurochem*. 90, 155-163.
- Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R. (2006) Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology*. 147, 5549-5556.
- Tsigos C, Young RJ, White A. (1993) Diabetic neuropathy is associated with increased activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Clin Endocrinol Metab*. 76, 554-558.
- Vahdatpour C, Dyer AH, Tropea D. (2016) Insulin-Like Growth Factor 1 and Related Compounds in the Treatment of Childhood-Onset Neurodevelopmental Disorders. *Front Neurosci*. 10, 450.
- Wadhwa PD, Sandman CA, Porto M, Dunkel-Schetter C, Garite TJ. (1993) The association between prenatal stress and infant birth weight and gestational age at birth: a prospective investigation. *Am J Obstet Gynecol*. 169, 858-865.
- Waltereit R, Weller M. (2003) Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* 27, 99-106.
- Wang AT, Mullan RJ, Lane MA, Hazem A, Prasad C, et al. (2012) Treatment of hyperprolactinemia: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev*. 1, 33.
- Wang L, Zhou K, Fu Z, Yu D, Huang H, Zang X, Mo X (2017) Brain Development and Akt Signaling: the Crossroads of Signaling Pathway and Neurodevelopmental Diseases. *J Mol Neurosci*. 61, 379-384.
- Wilcoxon, J.S., Redei, E.E (2007) Maternal glucocorticoid deficit affects hypothalamic-pituitary-adrenal function and behavior of rat offspring. *Horm. Behav*. 51, 321-327.
- Wright RL, Lightner EN, Harman JS, Meijer OC, Conrad CD. (2006) Attenuating corticosterone levels on the day of memory assessment prevents chronic stress-induced impairments in spatial memory. *Eur J Neurosci*. 24, 595-605.
- Yang S, Roselli F, Patchev AV, Yu S, Almeida OF. (2013) Non-receptor-tyrosine kinases integrate fast glucocorticoid signaling in hippocampal neurons. *J Biol Chem*. 16, 23725-23739.
- Yasuda S, Sugiura H, Tanaka H, Takigami S, Yamagata K. (2011) p38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutic drugs for neural diseases. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 11, 45-59.
- Ye P, D'Ercole AJ. (2006) Insulin-like growth factor actions during development of neural stem cells and progenitors in the central nervous system. *J Neurosci Res*. 83, 1-6.
- Yoshioka M, Tanaka Ki, Miyazaki I, Fujita N, Higashi Y, et al. (2002) The dopamine

- agonist cabergoline provides neuroprotection by activation of the glutathione system and scavenging free radicals. *Neurosci Res.* 43, 259–267.
- Young EA, Carlson NE, Brown MB. (2001) Twenty-four-hour ACTH and cortisol pulsatility in depressed women. *Neuropsychopharmacology.* 25(2): 267-276.
- Zagron G, Weinstock M. (2006) Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioural alterations induced by prenatal stress in male and female rats. *Behav Brain Res.* 175, 323-328.
- Zou W, Yang S, Zhang T, Sun H, Wang Y, Xue H, Zhou D (2015) Hypoxia enhances glucocorticoid-induced apoptosis and cell cycle arrest via the PI3K/Akt signaling pathway in osteoblastic cells. *J Bone Miner Metab.* 33, 615-624.
- 厚生労働省 人口動態調査 平成 29 年我が国の人口動態（平成 27 年までの動向）<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/dl/81-1a2.pdf>
- 厚生労働省 患者調査 http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-12201000-Shakaiengokyokushougaihokenfukushibu-Kikakuka/0000108755_12.pdf

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 小高 陽樹 印

(2017 年 10 月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○(1) <u>Odaka H</u>, Numakawa T, Yoshimura A, Nakajima S, Adachi N, Ooshima Y, Inoue T, Kunugi H. Chronic glucocorticoid exposure suppressed the differentiation and survival of embryonic neural stem/progenitor cells: Possible involvement of ERK and PI3K/Akt signaling in the neuronal differentiation. <i>Neurosci Res.</i> 113, 28-36, 2016.</p> <p>○(2) <u>Odaka H</u>, Numakawa T, Adachi N, Ooshima Y, Nakajima S, Katanuma Y, Inoue T, Kunugi H. Cabergoline, a dopamine D2 receptor agonist, prevents neuronal cell death under oxidative stress via reducing excitotoxicity, <i>PLoS One.</i> 6, e99271, 2014.</p>
総説	<p>(1) <u>Odaka H</u>, Adachi N, Numakawa T. Impact of glucocorticoid on neurogenesis. <i>Neural Regen Res.</i> 12, 1028-1035, 2017.</p> <p>(2) Numakawa T, Richards M, Nakajima S, Adachi N, Furuta M, <u>Odaka H</u>, Kunugi H. The role of brain-derived neurotrophic factor in comorbid depression: possible linkage with steroid hormones, cytokines, and nutrition. <i>Frontiers in Psychiatry.</i> 5, 136, 2014.</p>
講演 (国内)	<p>(1) 小高 陽樹、沼川 忠広、安達 直樹、大島 淑子、中島 進吾、片沼 佑介、井上 貴文、功刀浩 「培養大脳皮質ニューロンに対するカベルゴリン（ドーパミン D2 受容体アゴニスト）の神経保護効果の解析」 『第 57 回日本神経化学学会大会』 2014 年 9 月-10 月</p> <p>(2) <u>Odaka H</u>, Numakawa T, Yoshimura A, Adachi N, Nakajima S, Era T, Inoue T, Kunugi H. Influence of chronic glucocorticoid exposure on proliferation and differentiation of rat neural stem cells in vitro 『熊本医学・生物科学国際シンポジウム』 2014 年 9 月</p> <p>(3) 小高 陽樹、沼川 忠広、安達 直樹、大島 淑子、井上 貴文、功刀 浩. 「ドーパミン D2 受容体アゴニストであるカベルゴリンの発揮する神経保護作用」『Neuro2013』 2013 年 6 月</p>
その他 (論文)	<p>(1) Yoshimura A, Numakawa T, <u>Odaka H</u>, Adachi N, Tamai Y, Kunugi H. Negative regulation of microRNA-132 in expression of synaptic proteins in neuronal differentiation of embryonic neural stem cells. <i>Neurochem Int.</i> 97, 26-33. 2016</p> <p>(2) Nakajima S, Numakawa T, Adachi N, Yoon HS, <u>Odaka H</u>, Ooshima Y, Kunugi H. The inactivation of extracellular signal-regulated kinase by glucagon-like peptide-1 contributes to neuroprotection against oxidative stress. <i>Neurosci Lett.</i> 616, 105-110. 2016</p> <p>(3) Nakajima S, Numakawa T, Adachi N, Ooshima Y, <u>Odaka H</u>, Yoshimura A, Kunugi H. Self-amplified BDNF transcription is a regulatory system for synaptic maturation in cultured cortical neurons. <i>Neurochem Int.</i> 91, 55-61, 2015</p> <p>(4) Adachi N, Numakawa T, Nakajima S, Fukuoka M, <u>Odaka H</u>, Katanuma Y, Ooshima Y, Hohjoh H, Kunugi H. Glucocorticoid affects dendritic transport of BDNF-containing vesicles. <i>Sci Rep.</i> 5, 12684, 2015</p> <p>(5) Wakabayashi C, Numakawa T, <u>Odaka H</u>, Ooshima Y, Kiyama Y, Manabe T, Kunugi H, Iwakura Y. IL-1 receptor-antagonist (IL-1Ra) knockout mice show anxiety-like behavior by aging. <i>Neurosci Lett.</i> 599, 20-25, 2015</p> <p>(6) Numakawa T, Nakajima S, Yamamoto N, Ooshima Y, <u>Odaka H</u>, Hashido K, Adachi N, Kunugi H. Basic fibroblast growth factor induces miR-134 upregulation in astrocyte for cell maturation. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 456, 465-470, 2015</p> <p>(7) <u>Odaka H</u>, Arai S, Inoue T, Kitaguchi T. Genetically-encoded yellow fluorescent cAMP indicator with an expanded dynamic range for dual-color imaging. <i>PLoS One.</i> 9, e100252, 2014</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
その他 （講演）	<p>(8) Katanuma Y, Numakawa T, Adachi N, Yamamoto N, Ooshima Y, <u>Odaka H</u>, Inoue T, Kunugi H. Phencyclidine rapidly decreases neuronal mRNA of brain-derived neurotrophic factor. <i>Synapse</i>. 68, 257-265. 2014</p> <p>(9) Numakawa T, Matsumoto T, Ooshima Y, Chiba S, Furuta M, Izumi A, Ninomiya-Baba M, <u>Odaka H</u>, Hashido K, Adachi N, Kunugi H. Impairments in brain-derived neurotrophic factor-induced glutamate release in cultured cortical neurons derived from rats with intrauterine growth retardation: possible involvement of suppression of TrkB/phospholipase C-γ activation. <i>Neurochem Res</i>. 39, 785-792. 2014</p> <p>(1) <u>小高 陽樹</u>、新井 敏、井上 貴文、北口 哲也 「Improvement of genetically-encoded yellow fluorescent cAMP indicator for dual-color imaging」『第 37 回日本分子生物学会年会』2014 年 11 月</p>